

TESIS DE DOCTORADO

**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE QUORUM SENSING
EN *ACINETOBACTER BAUMANNII* Y SU INFLUENCIA EN LA
MOTILIDAD Y EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA**

Celia Mayer Mayer

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Caracterización del sistema de quorum sensing
en *Acinetobacter baumannii* y su influencia en la motilidad y en la
formación de biopelícula

Dña. Celia Mayer Mayer

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, a 30 de Abril de 2018.

Fdo.



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Caracterización del sistema de quorum sensing
en *Acinetobacter baumannii* y su influencia en la motilidad y en la
formación de biopelícula

Dña. Ana María Otero Casal
D. Manuel Romero Bernárdez

INFORMA/N:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Celia Mayer Mayer, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, a 30 de Abril de 2018.

Fdo.

Fdo.



Agradecimientos

A Ana María Otero Casal, por animarme a realizar este trabajo desde el principio, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por todo su tiempo dedicado y por enseñarme la exigencia requerida para adentrarse en el mundo de la investigación.

A Manuel Romero Bernárdez, por sus conocimientos y explicaciones, su dedicación para ayudarme a resolver dudas y problemas, por su riguroso punto de vista y su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

I would like to thank Paul Williams from the University of Nottingham for giving me the opportunity of taking part in his research laboratory of the Centre for Biomolecular Sciences.

Se agradece la participación puntual en este trabajo de Marta Arias Otero y Diego Rey Varela, mientras realizaban un Trabajo de Fin de Grado y un Proyecto de Fin de Máster, respectivamente.

Agradecer también a Soraya Rumbo Feal, Eva Gato y Margarita Poza de la Universidade de A Coruña por la realización de los mutantes de *A. baumannii* ATCC17978 utilizados en este trabajo. Y a María Tomás del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)–INIBIC, por la cesión de las cepas clínicas.

I thank Prof. Philip N. Rather from the Emory University School of Medicine of Atlanta (USA) for kindly providing us with the *abaI::Km* mutant strain of *A. nosocomialis* M2.

A Maribel por su eterna ayuda desinteresada, por todos sus consejos y apoyo y por aportar siempre sus conocimientos y su perspectiva. Ao Pedro e ao Hugo, obrigada pela boa companhia e pelos ótimos e entretidos momentos vividos neste comprido período. A Isa polos bos tempos compartidos no laboratorio. A Andrea por su apoyo y colaboración, por su compañía y por todos los cafés compartidos durante todos estos años. También me gustaría agradecer a los compañeros del pasillo por su ayuda prestada y a los del laboratorio de Nottingham que hicieron que pasara una corta pero agradable estancia.

Por último, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida en estos últimos cuatro años, de las que siempre aprendo, y a todos aquellos que se interesaron por este trabajo o estais a punto de hacerlo.

A mi familia.

El trabajo contenido en la presente memoria ha sido parcialmente financiado por el programa “Axudas do Programa de Consolidación e Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas (GPC)” de la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia (ED431B2017/53).



Abreviaturas

ACB	Complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i>
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i> , proteína transportadora de acilos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNe	ADN extracelular
AHL	<i>N</i> -acilhomoserín lactona
AI	Autoinductor
AI-2	Autoinductor 2
AI-3	Autoinductor 3
AIP	Péptido autoinductor
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN transferente
ATP	Adenosín trifosfato
c-di-GMP	3',5'-diguanylato cíclico
DAP	1,3-diaminopropano
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético
EMBL-EBI	<i>European Molecular Biology Laboratory-The european Bioinformatics Institute</i>
Gm	Gentamicina
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas
HSL	Homoserín lactona
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
LBM	Medio LB modificado
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-acoplada a espectrometría de masas
LPS	Lipopolisacárido
MCS	Sitio de clonación múltiple (<i>Multiple Cloning Site</i>)
Medio AB	Medio para <i>Agrobacterium</i> (<i>Agrobacterium medium</i>)
MMA	Medio mínimo de <i>Acinetobacter</i>
MOPS	Ácido morfolinopropanesulfónico
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
NRPS	<i>Non-Ribosomal Peptide Synthase</i> , sintasa de péptidos no ribosomales
ORF	<i>Open reading frame</i> , marco abierto de lectura
PBS	<i>Phosphate buffered salined</i> , tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	Tampón ácido piperazina- <i>N,N'</i> -bis(2-etanosulfónico)
PNAG	Poli- β -(1-6)- <i>N</i> -acetil glucosamina
PON	Paraoxonasa
PQS	<i>Pseudomonas quinolone signal</i> , señal quinolona de <i>Pseudomonas</i>
QQ	<i>Quorum quenching</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa
QS	<i>Quorum sensing</i>
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division</i> (tipo de bomba de expulsión)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SOD	Superóxido dismutasa
Tc	Tetraciclina
TM	Tipado molecular
TSA-I	Agar de triptona y soja con 1% de NaCl
UFCs	Unidades formadoras de colonias
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido



RESUMEN

Acinetobacter baumannii es un importante patógeno nosocomial Gram-negativo de especial interés debido a su habilidad para generar multirresistencias a antibióticos y a su formidable capacidad de supervivencia en forma de biopelículas, causando un gran número de infecciones humanas. Entre los mecanismos de virulencia de *A. baumannii*, destacan la motilidad y la formación de biopelícula, fenotipos controlados mediante una red compleja de factores donde se encuentra el sistema de comunicación bacteriano dependiente de la densidad celular denominado *Quorum Sensing* (QS), que está mediado por señales acil homoserín lactonas (AHLs). Diversos estudios han indicado la influencia del QS en *Acinetobacter*, sin embargo, el papel exacto que desempeña en estos fenotipos y los mecanismos que controlan la producción de AHLs todavía estaban por determinar. En este trabajo, por lo tanto, se caracterizó el sistema de QS de *A. baumannii* ATCC17978 y se analizó su influencia sobre la motilidad y la producción de biopelícula.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é un importante patóxeno nosocomial Gram-negativo de especial interese debido á súa habilidade para xerar multirresistencias a antibióticos e á súa formidable capacidade de supervivencia en forma de biopelículas, causando un gran número de infeccións humanas. Entre os mecanismos de virulencia de *A. baumannii*, destacan a motilidade e a formación de biopelícula, fenotipos controlados mediante unha rede complexa de factores onde se atopa o sistema de comunicación bacteriano dependente da densidade celular denominado *Quorum Sensing* (QS), que está mediado por sinais acil homoserín lactonas (AHLs). Diversos estudos indicaron a influencia do QS en *Acinetobacter*, no entanto, o papel exacto que desempeña nestes fenotipos e os mecanismos que controlan a produción de AHLs aínda estaban por determinar. Polo tanto, neste traballo caracterizouse o sistema de QS de *A. baumannii* ATCC17978 e analizouse a súa influencia sobre a motilidade e a produción de biopelícula.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an important Gram-negative nosocomial pathogen of special interest due to the emergence and widespread of antibiotic resistance. Moreover, *A. baumannii* presents a formidable surviving capacity as biofilm former, causing several nosocomial infections. Among the virulence factors that contribute to *A. baumannii* pathogenesis, motility and biofilm formation are at the utmost importance. The control of both phenotypes is multifactorial, involving several regulatory networks and including the cell density-dependent communication system known as Quorum Sensing (QS) that is mediated by acyl homoserine lactones (AHLs). Different reports have described the involvement of QS in *Acinetobacter*, however, the specific role of QS system in both phenotypes and factors that control the AHL production have not been elucidated yet. Therefore, the aim of this work was to study the QS system of *A. baumannii* ATCC17978 and its influence on motility and biofilm formation.





ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Acinetobacter</i> spp.	3
1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	5
2. Virulencia en <i>Acinetobacter</i> spp.....	6
2.1. Motilidad en <i>Acinetobacter</i> spp.	9
2.2. Biopelícula en <i>Acinetobacter</i> spp.	12
3. Quorum sensing (QS).....	18
3.1. QS en <i>Acinetobacter</i> spp.....	20
4. Quorum quenching (QQ).....	25
4.1. Degradación enzimática de AHLs	26
4.2. QQ en <i>Acinetobacter</i> spp.....	28
4.3. QQ contra la virulencia de <i>A. baumannii</i>	31
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Cepas bacterianas y plásmidos	39
2. Extracción de AHLs	39
3. Detección de AHLs	42
3.1. Detección de AHLs mediante biosensores	42
3.2. Identificación del perfil de AHLs mediante HPLC-MS	43
4. Detección de actividad QQ.....	43
4.1. Detección de actividad QQ mediante HPLC-MS.....	45
5. Ensayos de motilidad.....	45
5.1. Motilidad asociada a superficie	45
5.2. Motilidad de tipo <i>twitching</i>	46
6. Búsqueda de enzimas de QS y de QQ en <i>A. baumannii</i>	46
7. Clonación de enzimas de QQ	47
7.1. Diseño de cebadores	47
7.2. Condiciones de PCR.....	48
7.3. Secuenciación y análisis de secuencias.....	48
7.4. Clonación de las secuencias de interés	48
7.5. Sobre-expresión y purificación.....	50
8. Caracterización de las enzimas de QQ.....	51
8.1. Actividad QQ de las lactonasas de <i>A. baumannii</i>	51
8.2. Especificidad y cinética de degradación de AHLs de Aii20J.....	52
9. Ensayo de adherencia celular	52
10. Formación de biopelícula de <i>A. baumannii</i>	52
10.1. Formación de biopelícula en sistemas clásicos.....	52
10.2. Formación de película en la interfase aire-líquido.....	53
10.3. Ensayo de cristal violeta	53
10.4. Ensayo de resazurina	53
10.5. X-CELLigence®.....	53
10.6. Bioflux TM	53
10.7. Formación de biopelícula en un biorreactor de biopelícula de interfase.....	54
10.8. Análisis mediante microscopía	55
10.9. Formación de biopelícula en el modelo de adhesión activa	55
11. PCR cuantitativa	56
12. Estadística.....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
CAPÍTULO 1. Motilidad y quorum sensing en <i>A. baumannii</i>	59

<i>Antecedentes</i>	59
<i>Resultados</i>	61
1. QS en <i>A. baumannii</i>	61
1.1. Producción de señales AHLs en <i>A. baumannii</i>	61
1.2. Identificación del perfil de AHLs en <i>A. baumannii</i> por HPLC-MS	62
1.3. Identificación del perfil de AHLs en cepas clínicas de <i>Acinetobacter</i>	69
1.4. Identificación de genes de QS en el género <i>Acinetobacter</i>	71
2. Motilidad asociada a superficie en <i>A. baumannii</i> y <i>A. nosocomialis</i>	73
2.1. Efecto del tipo de agar y del medio de cultivo	73
2.2. Efecto del QQ sobre la motilidad asociada a superficie	75
2.3. Efecto de los nutrientes y de la osmolaridad sobre la motilidad asociada a superficie.....	78
2.4. Efecto de la temperatura sobre la motilidad asociada a superficie	80
2.5. Efecto de la luz azul y de la temperatura sobre la motilidad asociada a superficie.....	81
2.6. Efecto de la virstatina sobre la motilidad asociada a superficie	83
3. Motilidad asociada a superficie en el mutante $\Delta adeB$ de la bomba AdeABC. 85	
4. Motilidad asociada a superficie en cepas clínicas de <i>Acinetobacter</i>	86
4.1. Efecto del medio de cultivo, del QS y del QQ.....	86
5. Motilidad de tipo <i>twitching</i> en <i>A. baumannii</i>	88
6. Efecto de la sal y agitación a nivel molecular	88
7. Efecto de la adición de señales de QS exógenas	90
<i>Discusión</i>	93
CAPÍTULO 2. Quorum quenching en <i>A. baumannii</i>.	103
<i>Antecedentes</i>	103
<i>Resultados</i>	105
1. QQ en <i>A. baumannii</i> ATCC17978 y en <i>A. nosocomialis</i> M2	105
2. Búsqueda de enzimas con actividad QQ en <i>A. baumannii</i> ATCC17978	112
3. Clonación y sobre-expresión de los genes responsables de la actividad QQ de <i>A. baumannii</i>	116
3.1. Clonación y sobre-expresión de las secuencias de interés.....	116
3.2. Caracterización de la actividad QQ de las secuencias de interés.....	118
3.3. Purificación.....	120
4. Expresión génica de las distintas lactonasas de <i>Acinetobacter</i>	125
<i>Discusión</i>	129
CAPÍTULO 3. Quorum sensing y formación de biopelícula en <i>A. baumannii</i> .. 135	
<i>Antecedentes</i>	135
<i>Resultados</i>	136
1. Evaluación de distintos métodos de cultivo para la formación de biopelícula de <i>A. baumannii</i>	136
1.1. Formación de biopelícula en placas microtiter	136
1.2. Formación de biopelícula en tubos eppendorf y X-CELLigence®	138
1.3. Formación de biopelícula en el sistema BioFlux™	140
1.4. Ensayo de adherencia celular.....	142
2. Formación de biopelícula de <i>A. baumannii</i> ATCC17978 en un biorreactor de interfase	143
2.1. Biopelícula de <i>A. baumannii</i> ATCC17978 y del mutante $\Delta abaI$	146
2.2. Suplementación de la biopelícula con la OHC12-HSL	153
2.3. Efecto del QQ sobre la biopelícula de <i>A. baumannii</i> ATCC17978	155
<i>Discusión</i>	164

CONCLUSIONES	173
RESUMEN	179
BIBLIOGRAFÍA	187
ANEXOS	217







INTRODUCCIÓN



1. *Acinetobacter* spp.

El género *Acinetobacter* comprende un grupo de especies Gram-negativas, que pertenecen a la clase de Gammaproteobacteria, orden *Pseudomonadales* y familia *Moraxellaceae*. Presentan morfología de cocobacilos y son microorganismos estrictamente aerobios, no fermentativos, no flagelados, catalasa positivos y oxidasa negativos (Bergogne-Bérézin y Towner 1996). Sin embargo, este género presenta una historia taxonómica larga y complicada que ha sufrido una revisión extensa en las últimas décadas con múltiples cambios (Towner 2009). En 1911, el microbiólogo holandés Beijerinck, aisló y describió el primer ejemplar a partir del suelo que denominó *Micrococcus calco-aceticus* (Howard et al. 2012). 43 años más tarde Brisou y Prevot propusieron una designación para el género que fue ampliamente aceptada en 1968 (Brisou y Prevot 1954). Sin embargo, no fue hasta 1971 que *Acinetobacter* fue reconocido oficialmente, en base a un exhaustivo estudio, como un único género que no era posible sub-clasificarlo en distintas especies basándose sólo en características fenotípicas (Baumann et al. 1968, Howard et al. 2012). Debido al insuficiente criterio para su identificación utilizado hasta ese momento, comúnmente se referían a las especies del género como una sola simple especie: *Acinetobacter calcoaceticus*. En 1986, se describió un sistema fenotípico para la identificación de especies del género en el cual se delinearón, mediante hibridación ADN-ADN, 12 grupos distintos de ADN (genoespecies) de *Acinetobacter*, de los cuales todos salvo dos de ellos podían ser diferenciados mediante 28 pruebas fenotípicas (Bouvet y Grimont 1986). Además, en este trabajo se propusieron 4 nuevas especies: *A. baumannii* (en honor a los biólogos Paul y Linda Baumann), *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii* y *Acinetobacter junii* y se corrigieron las descripciones para *A. calcoaceticus* y *Acinetobacter lwoffii* (Bouvet y Grimont 1986). Más tarde, Tjernberg y Ursing pudieron identificar la mayoría de 198 cepas de *Acinetobacter*, agrupándolas en las genoespecies descritas por Bouvet y Grimont, además de describir tres grupos nuevos de hibridación ADN-ADN (Tjernberg y Ursing 1989). Estos autores numeraron sus grupos de acuerdo a la clasificación de Bouvet y Grimont y anotaron sus tres grupos nuevos del 13 al 15, sin embargo, no pudieron reproducir los resultados de estos autores en relación a los grupos 8 y 9 establecidos, por lo que omitieron este último en su sistema de clasificación (Tjernberg y Ursing 1989). En otro trabajo, Bouvet y Jeanjean reportaron cinco grupos más (nombrados del 13 al 17) de cepas de *Acinetobacter*. De éstos, el número 13 se corresponde con el grupo 14 de la nomenclatura de Tjernberg y Ursing (Bouvet y Jeanjean 1989). El gran número de grupos genotípicamente distintos refleja la gran diversidad de este género (Gerner-Smidt et al. 1991). Actualmente el género *Acinetobacter* compromete más de 50 especies con nombres validados (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>) y un gran número de taxones agrupados en genoespecies delineados por hibridación ADN-ADN (Dijkshoorn et al. 2007) o especies con nombres publicados no válidos.

Las especies del género *Acinetobacter* están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, tanto en el suelo como en el agua dulce o salada, en aguas residuales y sedimentos (Bergogne-Bérézin y Towner 1996, Towner 2009). Aunque el género *Acinetobacter* incluye especies no patogénicas habitantes normales de la microbiota de la piel humana, del tracto digestivo y del sistema respiratorio, un gran número de especies de *Acinetobacter* causan una serie de infecciones nosocomiales oportunistas en humanos, incluyendo septicemia, neumonía, endocarditis, meningitis, infecciones de heridas y piel e infecciones del tracto urinario (Bergogne-Bérézin y Towner 1996, Towner 2009).

Cuatro especies genómicas de este género, estrechamente relacionadas entre ellas más que con otras especies del género, difíciles de diferenciar mediante pruebas fenotípicas e indistinguibles mediante técnicas de hibridación ADN-ADN, conforman el denominado complejo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* o ACB (Gerner-Smidt et al. 1991): *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, y dos genoespecies (gen. sp.): gen. sp. 3 (Bouvet y Grimont 1986) y gen. sp. 13TU (Tjernberg y Ursing 1989). Este hecho, sin embargo, no es muy apropiado desde una perspectiva clínica ya que combina tres de las especies más relevantes a nivel hospitalario, *A. baumannii* y las genoespecies 3 y 13TU, debido a su capacidad de causar brotes nosocomiales y adquirir multiresistencia a antibióticos (Joly-Guillou et al. 2005, Bonomo y Szabo 2006) y a la mayor frecuencia de aislamiento en especímenes humanos, con la especie medioambiental *A. calcoaceticus*, aislada asiduamente de suelos y aguas y que hasta lo que se conoce nunca se ha visto implicada en enfermedades clínicas severas (Dijkshoorn et al. 2007, Peleg et al. 2008). La gen. sp. 13TU solo se ha encontrado en el ambiente clínico mientras que la gen. sp. 3 parece ser más diversa ecológicamente encontrándose en comida y suelo y clínicamente en individuos tanto enfermos como sanos (Chu et al. 1999, Houang et al. 2001). Poco después, dos grupos adicionales de ADN se delinearon mediante hibridación ADN-ADN denominados gen. sp. “entre 1 y 3” y gen. sp. “cercaños a 13TU” (Gerner-Smidt y Tjernberg 1993). Los autores del estudio tampoco propusieron nombres formales para estos últimos dada la ausencia de claras diferencias características fenotípicas y/o porque había un número pequeño de cepas disponibles en ese momento. Recientemente, y considerando la importancia clínica de estos taxones se han planteado los nombres binomiales formales *Acinetobacter pittii* sp. nov. y *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. para designar las gen. sp. 3 y gen. sp. 13TU, respectivamente (Nemec et al. 2011).

Actualmente están disponibles varios métodos genotípicos para la identificación fiable y práctica de las especies del complejo ACB, como el ribotipado, el análisis de restricción del ARNr 16S o ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), el análisis de la región intergénica espaciadora del ARNr 16S-23S o la amplificación mediante PCR de genes intrínsecos de resistencia o la secuenciación de los genes *rpoB* (*RNA polymerase β -subunit*) y *gyrB* (*DNA gyrase subunit B*) (Dijkshoorn et al. 2007, Nemec et al. 2011). No obstante estos métodos se aplican mayoritariamente en el marco de la investigación y son muy limitados en los laboratorios clínicos al ser laboriosos, lentos y caros (La Scola et al. 2006, Zhang et al. 2013). Aunque la identificación de las genoespecies 3 y 13TU sigue siendo complicada (Nemec et al. 2011), las especies del complejo ACB se diferencian en su epidemiología, su resistencia a antibióticos, su patogenicidad y sus opciones terapéuticas (Zhang et al. 2013, Chen et al. 2014). Recientemente se ha propuesto el uso de la PCR múltiple diseñada para detectar fragmentos internos de la región intergénica del ARNr 16S-23S y los genes *gyrB* y *recA* para diferenciar especies del complejo ACB (Chen et al. 2014). Además, en ese trabajo, los aislados pertenecientes al grupo gen. sp. “entre 1 y 3” fueron identificados como *A. pittii*, mientras que los del gen. sp. “cercaños a 13TU” fueron identificados como *A. nosocomialis* o mostraron patrones combinados de ambos (Chen et al. 2014). Adicionalmente, se han descrito las técnicas MALDI-TOF MS (*Matrix assisted laser desorption ionisation — time of flight mass spectrometry*) y espectrometría de transformada de Fourier o FTIR como técnicas con interesante potencial en la discriminación de estas especies (Sousa et al. 2014).

Hasta los años 70, las infecciones nosocomiales de *A. baumannii* podían ser tratadas con éxito con antibióticos usados tradicionalmente. Sin embargo, a día de hoy,

las especies de *Acinetobacter* son resistentes a la mayoría de antibióticos usados comúnmente, incluidos los β -lactámicos y los aminoglicósidos (Bergogne-Bérézín y Towner 1996), demostrando la rapidez de este patógeno de adquirir resistencias. De hecho, especies del complejo ACB son las responsables de importantes brotes causando infecciones severas en zonas de conflicto como en la guerra de Afganistán o de Irak, de ahí el seudónimo de “Irakibacter” (Howard et al. 2012), o en desastres naturales como terremotos (Bhargava et al. 2010).

Adicionalmente, desde el punto de vista bacteriológico, el género *Acinetobacter* es particularmente interesante por otras razones. Varias especies de *Acinetobacter* son capaces de catabolizar un amplio rango de fuentes de carbono y metabolitos (Jung y Park 2015). Por ello, *Acinetobacter* se encuentra entre los microorganismos más utilizados para la biorremediación de suelos contaminados por petróleo (Smith et al. 2007).

1.1. *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii, el representante de mayor importancia a nivel hospitalario del género, se presenta como uno de los patógenos emergentes más problemáticos para las instituciones sanitarias a nivel global en los últimos años (Peleg et al. 2008, Roca et al. 2012). Al igual que sus organismos más próximos de relevancia médica, *A. baumannii* no es un organismo ubicuo, ya que se desconoce un hábitat natural fuera del ambiente hospitalario (Towner 2009). En los últimos años el interés por *A. baumannii* ha aumentado considerablemente, debido al incremento de la frecuencia de aparición de cepas multirresistentes a drogas por el uso excesivo e indebido de antibióticos de amplio espectro en hospitales que reducen las opciones terapéuticas para su tratamiento y ocasionan graves problemas entre pacientes inmunodeprimidos en unidades de cuidados intensivos (Bergogne-Bérézín y Towner 1996, Joly-Guillou et al. 2005, Rice 2006, Peleg et al. 2008). Además, *A. baumannii* es un patógeno propenso a acumular mecanismos de resistencia que conllevan al afloramiento alarmante de cepas pan-resistentes que le permiten aclimatarse velozmente a los cambios del ambiente bajo presión selectiva (Valencia et al. 2009, Howard et al. 2012, Roca et al. 2012). Gracias a esta extraordinaria habilidad, los miembros del complejo ACB son capaces de rellenar con rapidez los nichos ecológicos vacantes, debido a la eliminación de bacterias competidoras por adición de compuestos antimicrobianos de amplio espectro (Towner 2009). La relevancia clínica del patógeno nosocomial y oportunista *A. baumannii* está ocasionada por dos grandes rasgos. El primero de ellos es la presencia de multirresistencia a drogas adquirida mediante distintos mecanismos, como mutaciones o adquisición de elementos genéticos como plásmidos, transposones o islas de resistencia. De hecho, *A. baumannii* está considerado como un patógeno ESKAPE, junto con *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp., por las siglas en inglés de los seis organismos con la mayor capacidad de evadir los efectos de las terapias antimicrobianas modernas (Rice 2008). Además, la Organización Mundial de la Salud ha incluido a *Acinetobacter* en el grupo de bacterias patógenas de prioridad crítica más peligrosas para la salud humana en su última lista (año 2017), debido a que estas bacterias han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (los antibióticos más potentes disponibles para tratar las bacterias multirresistentes). El segundo rasgo clave es la habilidad para sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el hospedador humano y/o en el ambiente clínico, especialmente en unidades de cuidados intensivos hospitalarias, donde la formación de biopelícula o *biofilm* juega un papel fundamental (Roca et al. 2012). Además, varias especies del

género, incluida *A. baumannii*, son capaces de sobrevivir en condiciones extremas resistiendo a la disecación (hasta 27 días), condición que también le ha otorgado el sobrenombre de camellos de los procariontes, pudiendo resistir en el material clínico como un reservorio secundario (Jawad et al. 1998, Fournier et al. 2006). Asimismo, *A. baumannii* puede hospedarse en artrópodos como piojos, pulgas y garrapatas, que actúan como vectores de transmisión y reservorios (La Scola et al. 2001, Fournier et al. 2006).

Acinetobacter baumannii sp. nov. fue descrita en 1986 por Bouvet y Grimont, también clasificada mediante técnicas de hibridación de ADN como gen. sp. 2 (Bouvet y Grimont 1986). La mayoría de las cepas de *Acinetobacter* aisladas de pacientes humanos hasta ese momento pertenecen a esta especie (Bouvet y Grimont 1986) al igual que ocurre actualmente (Howard et al. 2012). La cepa *A. baumannii* ATCC17978 fue aislada en 1951 a partir de un niño con meningitis fatal (Piechaud y Second 1951, Baumann et al. 1968), antes del desarrollo de antibióticos como macrólidos (eritromicina), glicopéptidos (vancomicina) y cefalosporinas y otros β -lactámicos de generaciones posteriores. Se cree que esta cepa nunca estuvo expuesta al cloranfenicol, usado por primera vez en 1949 (Smith et al. 2007). *A. baumannii* ATCC17978 es resistente a los β -lactámicos pero muestra ligera resistencia a tetraciclina y es sensible a aminoglicósidos como la kanamicina (Smith et al. 2007). En 2007, se secuenció su genoma completo que está depositado en la base de datos del NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (Smith et al. 2007). La cepa tipo de la especie, *A. baumannii* ATCC19606^T, aislada de orina humana, también ha sido secuenciada (Peleg et al. 2012), aunque el ensamblaje de su genoma está incompleto en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/403>), por lo que en numerosos estudios, especialmente para la construcción de mutantes, se utiliza ATCC17978 como cepa de referencia de la especie. *A. baumannii* ATCC17978, presenta 28 islas genéticas exógenas, donde se encuentra el mayor número de marcos abiertos de lectura u ORFs (*open reading frames*), indicando que el genoma ha adquirido una vasta cantidad de ADN foráneo. 16 de estas islas contienen genes implicados en la virulencia de este patógeno, como factores de virulencia o genes de resistencia a antibióticos (Smith et al. 2007). Por lo tanto, comprender los mecanismos que controlan la expresión de los genes de virulencia y la propagación de este patógeno es fundamental para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y para el desarrollo de nuevas estrategias antipatogénicas en especies de *Acinetobacter*.

Por otra parte, *A. baumannii* M2, aislada en 1996 a partir de una infección de cadera de un paciente de Cleveland (EEUU), ha sido estudiada en numerosos laboratorios (Carruthers et al. 2013), por lo que gran parte de la bibliografía de *A. baumannii* se encuentra referida a esta cepa. Sin embargo, recientemente ha sido reclasificada como *A. nosocomialis* M2 (Carruthers et al. 2013), haciendo necesario el estudio de determinadas características en *A. baumannii* todavía por explorar.

2. Virulencia en *Acinetobacter* spp.

A pesar de que varias especies de *Acinetobacter* representan un problema a nivel mundial, el conocimiento sobre este patógeno es escaso en comparación con otros patógenos humanos oportunistas mejor caracterizados, como *P. aeruginosa* (Fournier et al. 2006).

Dos estrategias clave de supervivencia asociadas a virulencia promueven la supervivencia de *A. baumannii* dentro y fuera del hospedador: la capacidad de formar biopelículas que le permiten crecer persistentemente en condiciones desfavorables y distintos ambientes y la resistencia a antimicrobianos intrínseca o adquirida. Además,

para que *A. baumannii* desarrolle su patogénesis, son necesarios múltiples factores de virulencia, entre los que cabe destacar la adherencia a superficies y motilidad sobre superficies que le permiten colonizar distintos sustratos y la formación posterior de biopelículas (Gaddy y Actis 2009, Antunes et al. 2014, Longo et al. 2014). La adquisición de elementos genéticos móviles puede suceder por contacto con bacterias que comparten los mismos hábitats, como *P. aeruginosa* o Enterobacterias (Fournier y Richet 2006). La transformación genética natural también le facilita la integración estable en el cromosoma de genes de resistencia a drogas (Fournier y Richet 2006). Mediante mecanismos de adquisición genética *A. baumannii* incorpora enzimas degradadoras de antimicrobianos, como carbapenemasas y β -lactamasas (Fournier y Richet 2006).

Otros mecanismos de resistencia le permiten responder rápidamente a los nuevos antimicrobianos desarrollados, como cambios en proteínas de unión a penicilina que previenen su acción, alteraciones en la estructura y en el número de porinas en la superficie de la membrana celular que resultan en una disminución de la permeabilidad de membrana externa de la célula a los antibióticos y la actividad de las bombas de expulsión que disminuyen la concentración intracelular de los antibióticos expulsándolos fuera de la bacteria (Fournier y Richet 2006, Perez et al. 2007). Además, también son capaces de intercambiar material genético con otras bacterias capaces de crecer en ambientes con temperaturas menores, con importantes implicaciones para su contribución a la vasta propagación de los genes de resistencia a antibióticos en el ambiente (Towner 2009).

Estudios recientes demostraron que la sobre-expresión de las bombas de eflujo es un mecanismo eficiente para la resistencia a drogas en *Acinetobacter*. *A. baumannii* presenta varios sistemas de bombas de expulsión de antibióticos intrínsecos o adquiridos que contribuyen a su multiresistencia (Xing et al. 2014). En *A. baumannii* existen los sistemas AdeABC, AdeDE, AdeIJK o AdeFGH. La bomba de eflujo mejor caracterizada es la AdeABC, fundamental en bacterias Gram-negativas y esencial en la adquisición de resistencia a varias clases de antibióticos en *A. baumannii* (Magnet et al. 2001, Marchand et al. 2004). AdeABC es un sistema de tres componentes que utiliza ATP (adenosín trifosfato) para expulsar antibióticos fuera de la célula (Vila et al. 2007). Está codificada por el operón *adeABC* que codifica para AdeA, una proteína de fusión de membrana, AdeB, el transportador multidrogas miembro de la familia RND (*resistance-nodulation-cell division*) y AdeC, homólogo de una proteína de membrana exterior (Marchand et al. 2004, Vila et al. 2007). Estos genes se encuentran contiguos en el genoma y a su vez están regulados por el sistema de dos componentes AdeRS, en el cual *adeS* monitoriza las condiciones del ambiente activando o inactivando al regulador de respuesta *adeR* para el control de la expresión de la bomba (Marchand et al. 2004, Vila et al. 2007, Xing et al. 2014).

Entre los factores que contribuyen a la virulencia de *Acinetobacter* existen además varios determinantes patogénicos entre los que se encuentra la presencia de pili. Aunque es una bacteria no motil (ausencia de flagelo), el género *Acinetobacter* presenta apéndices bacterianos denominados fimbrias o pili, que se expresan en la superficie de bacterias. En general, los pili de *Acinetobacter* son codificados por el operón *csuA/BABCDE* o *csu* que contiene un complejo (*chaperone-usher pili assembly system*) necesario para la producción y ensamblaje de pili. Adicionalmente, los genes del operón *csu* también son necesarios para la adhesión inicial a la superficie durante la formación de biopelícula (Tomaras et al. 2003, 2008, Gaddy y Actis 2009, Luo et al. 2015). El operón *csu*, a su vez, está regulado por un sistema de dos componentes codificado por la sensora quinasa BfmS y el regulador de respuesta BfmR (Tomaras et al. 2008). Parece

ser que los pili de tipo I juegan un papel fundamental en la adherencia y formación de película (*pellicle*) formada en la interfase aire-líquido y biopelícula en *A. baumannii*, sin embargo, se necesitaría más investigación para conocer su contribución exacta bajo distintas condiciones (Eijkelkamp et al. 2014).

Los pili de tipo IV son complejos de proteínas grandes con componentes en la membrana tanto interna como externa de la célula bacteriana que participan en diversos procesos como transformación natural de bacterias y en la adherencia a superficies bióticas y abióticas (Harding et al. 2013, Eijkelkamp et al. 2014). En la expresión y ensamblaje de pili tipo IV, que participan en la motilidad de tipo *twitching* de *Acinetobacter*, se encuentran involucrados numerosos genes, unos en el ensamblaje (*pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilF*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP*, *pilQ*, *pilZ*, *pilW*), otros en la motilidad de tipo *twitching* (*pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilU*) y en el filamento pilina (*pilA*) (Clemmer et al. 2011).

Las proteínas de membrana externa también se han relacionado con la resistencia a antibióticos y la patogénesis en células del hospedador. La proteína OmpA (*outer membrane protein A*), la proteína de superficie de membrana más abundante en este patógeno, también está involucrada en la resistencia al sistema del complemento del hospedador y en la formación de biopelícula (Gaddy y Actis 2009, Roca et al. 2012). OmpA no solo facilita la adherencia a células eucariotas y superficies abióticas sino que también media la invasión y promueve la muerte celular de células epiteliales (Choi et al. 2005, Gaddy y Actis 2009). También se ha demostrado que el porcentaje de proteínas de membrana externa es mucho menor en *A. baumannii* que en otros patógenos como en *Escherichia coli*, permitiéndole reducir la permeabilidad de membrana (Prashanth et al. 2012). Además, se ha descrito que la proteína OmpA junto con las fimbrias de la superficie celular contribuyen a la adhesión de la bacteria a células epiteliales del hospedador (Howard et al. 2012).

La proteína de membrana externa denominada Bap (*biofilm-associated protein*) está directamente involucrada en la formación de biopelícula (Loehfelm et al. 2008). Tanto es así, que una región de esta proteína puede ser usada como biomarcador en el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico de *A. baumannii* (Noori et al. 2014).

La proteína adhesina de superficie de *A. baumannii* denominada autotransportador trimérico (Ata), contribuye a la virulencia de este patógeno mediando en la adhesión celular (Betancor et al. 2012).

En *A. baumannii* se han descrito varios reguladores de dos componentes que le permiten detectar los cambios en el ambiente para adaptarse a ellos. Las sensoras quinasas juegan un papel fundamental en la biología bacteriana y su patogénesis, ayudándole a percibir y responder a los estímulos ambientales como estrategia de supervivencia (Cerqueira et al. 2014). Además del sistema BfmSR y del sistema AdeRS, se ha descrito recientemente el sistema de dos componentes GacSR, en el cual la sensora quinasa actúa como un regulador de virulencia global que podría regular la síntesis de pili, ya que en un mutante de *gacS* disminuye la expresión de varios genes del operón *csu* (Cerqueira et al. 2014).

Como muchas otras bacterias, *Acinetobacter* secreta vesículas de membrana externa que están compuestas por lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa, lípidos, ADN o ARN y se cree que participan además de en los procesos de *quorum sensing* o QS, en el transporte de otros factores de virulencia, en la inhibición de fagosomas, en la formación de biopelícula y en la transferencia genética (McConnell et al. 2011, Roca et al. 2012). Otras proteínas clave que se ha visto que contribuyen a la virulencia de *A. baumannii* son las enzimas hidrolíticas como la fosfolipasa C, que incrementa la

toxicidad de las células epiteliales, o la fosfolipasa D, importante para la resistencia al suero humano e invasión de células epiteliales (Roca et al. 2012).

Los polisacáridos de superficie también intervienen en la virulencia de este patógeno. Entre los factores de virulencia identificados en esta bacteria se encuentra un sistema general de *O*-glicosilación que es importante para la formación de biopelícula y la virulencia y el polisacárido capsular, esencial para la resistencia al sistema del complemento inmunitario del hospedador (Lees-Miller et al. 2013).

Hay que nombrar a los lipopolisacáridos o LPS que contienen azúcares de cadenas largas o el poli- β -(1-6)-*N*-acetil glucosamina o PNAG, crítico para el desarrollo de la biopelícula, que además de tener un rol en adherencia entre célula-célula y a la superficie, es también un factor de virulencia y protege la bacteria contra las defensas innatas del hospedador (Joly-Guillou et al. 2005, Choi et al. 2009, Roca et al. 2012).

Además, los sistemas de adquisición de hierro y los sideróforos, compuestos quelantes de hierro como la acinetobactina (Dorsey et al. 2003), que le permiten competir con las proteínas de unión a hierro de hospedadores para sobrellevar la falta de hierro impuesta por el hospedador (Vallenet et al. 2008), intervienen en la patogénesis de especies de *Acinetobacter* (Roca et al. 2012). Recientemente, se ha descrito un gen, *feoA* (A1S_0242), que forma parte del sistema de captación de hierro Feo, implicado en la virulencia de *A. baumannii* (Álvarez-Fraga et al. 2018).

Por último, la fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina, que constituye la mayor modificación post-traducciona en células, originalmente descrita exclusivamente en organismos eucariotas aunque ahora se conoce que es un mecanismo importante de señalización en bacterias, también podría jugar un rol en la regulación de mecanismos asociados con la patogenicidad y resistencia a drogas de *A. baumannii* (Soares et al. 2014).

Entre las características fisiológicas que se han relacionado con la virulencia del género *Acinetobacter*, son de especial relevancia la motilidad y la formación de biopelícula, en la cual aislados clínicos de *A. baumannii* son capaces de sobrevivir periodos largos de disecación e inanición a través de células en estado latente embebidas en la matriz de estas biopelículas, que los hacen más resistentes a la mayoría de antimicrobianos (Gaddy y Actis 2009, Gayoso et al. 2014).

2.1. Motilidad en *Acinetobacter* spp.

A pesar de que el nombre “*Acinetobacter*” proviene del griego “*akineto*” (no motil), acuñado en los primeros estudios sobre este patógeno y que la secuenciación de los genomas de *A. baumannii* han revelado que carecen de genes de flagelos (Smith et al. 2007), se han observado varias formas de motilidad independiente de flagelo en diferentes especies del género, con discrepancias en relación a los fenotipos motiles en la bibliografía (Henrichsen y Blom 1975, Barker y Maxted 1975, Mukerji y Bhopale 1983, Henrichsen 1983, 1984, Bouvet y Grimont 1987, Kang y Park 2010b). Adicionalmente, existe un gran número de disimilitudes entre los ensayos de motilidad utilizados, poca reproducibilidad y diferencias entre cepas, posiblemente debido a distintas condiciones experimentales, que dificultan la clasificación de los fenotipos motiles y la elucidación de su importancia en la virulencia de distintas cepas y especies de *Acinetobacter*.

La motilidad de *Acinetobacter* es un fenotipo complejo que está conectado con otras características cruciales como las fimbrias o pili, estímulos ambientales o factores que producen estrés celular. En el control de la motilidad de las especies de *Acinetobacter* se han descrito diversas proteínas reguladoras, entre las que se incluyen la proteína de tipo histonas (*histone-like nucleoid structuring protein*) o H-NS, el

sistema regulador de dos componentes BfmRS que controla el operón *csu*, el sensor de luz azul *blsA*, la proteína sensora quinasa GacS o el QS, que se describirá con detalle más adelante (Tomaras et al. 2008, Mussi et al. 2010, Clemmer et al. 2011, Eijkelkamp et al. 2013, Cerqueira et al. 2014).

Actualmente, la mayoría de los estudios han descrito dos formas distintas de migración de las especies de *Acinetobacter* sobre la superficie según el porcentaje de agar: la motilidad de tipo *twitching*, migración que ocurre en la interfase entre la capa de agar y una superficie sólida como el fondo de una placa Petri, en la cual están involucrados los pili de tipo IV y se observa con concentraciones de agar del 1% (Mussi et al. 2010, Harding et al. 2013) y la motilidad asociada a superficie que se produce con bajas concentraciones de agar del rango de 0,2-0,5% (Mussi et al. 2010, Clemmer et al. 2011, Skiebe et al. 2012, Harding et al. 2013), que varios autores han propuesto como independiente de pili (Harding et al. 2013). Los genes que codifican para pili de tipo IV han sido identificados en múltiples genomas de *Acinetobacter* spp. (Smith et al. 2007, Adams et al. 2008) y se ha demostrado que este género produce pili funcionales con PilA constituyendo la mayor subunidad de pilina (Harding et al. 2013). La función de los pili de tipo IV parece ser esencial para la motilidad de tipo *twitching* ya que mutantes de genes de pili como *pilA*, *pilD* y *pilT* no presentaron este tipo de motilidad en *A. nosocomialis* M2, aunque mantuvieron la motilidad asociada a superficie en concentraciones de agar bajas (0,5%) (Harding et al. 2013). Sin embargo, el requerimiento específico de pili de tipo IV en la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* permanece ambiguo ya que Clemmer et al. (2011), observaron que un mutante de *pilT* que codifica para una ATPasa necesaria para la retracción de pili de tipo IV, resultó solamente en una reducción de aproximadamente el 50% de la motilidad asociada a superficie (0,35% de agar).

Los pili de tipo I de *Acinetobacter* spp. son codificados por el operón *csu*, regulado a su vez por el sistema de dos componentes BfmSR (Tomaras et al. 2003, 2008). Los mutantes de *bfmS* y *bfmR* no son motiles y en el mutante de *bfmR* no hay expresión del operón *csu* (Tomaras et al. 2008). El operón *csu* (A1S_2213-A1S_2218) se describió en la cepa tipo *A. baumannii* ATCC19606^T donde es necesario para la adhesión a superficies, ya que mutantes de genes del operón, como *csuC* y *csuE*, resultaron en células no piliadas que no pudieron adherirse a la superficie (Tomaras et al. 2003). Los genes *csuA/B*, *csuB* y *csuE* están implicados en la formación de pili de tipo I. *CsuA/B* fue la proteína más abundante en matrices de polisacáridos asociadas a la película formada en la fase aire-líquido por distintas especies de *Acinetobacter* (Nait Chabane et al. 2014a). *CsuC* es una proteína chaperona que acelera el plegamiento de las subunidades de pili y *CsuD* es una proteína guía (*usher protein*) de membrana externa, necesaria para la biogénesis de fimbrias, responsable del ensamblaje y extensión del pili y *CsuE* codifica para una *tip adhesin* o una adhesina localizada en el extremo del apéndice (Tomaras et al. 2003). Análisis comparativos mostraron que existen operones similares en el genoma de otras especies como *A. baumannii* ATCC17978 (Tomaras et al. 2003, Smith et al. 2007, Gaddy y Actis 2009). Curiosamente, Eijkelkamp et al. (2011b) observaron una interrupción del gen *csuB* (A1S_2216) en una cepa multirresistente a drogas causante de un brote epidémico en Roma en 2005, *A. baumannii* ACICU (Iacono et al. 2008), al igual que un polimorfismo de nucleótido único en *A. baumannii* ATCC17978 en el mismo gen resultando en un *csuB* truncado o no funcional (Eijkelkamp et al. 2011b). De hecho, en ese estudio ATCC17978 mostró niveles bajos de unión a superficie en comparación con otras cepas (Eijkelkamp et al. 2011b). A mayores del operón *csu*, *A. baumannii* ATCC17978 y la cepa multirresistente a antibióticos *A. baumannii* AYE contienen tres clústeres (A1S_1507-A1S_1510,

AB57_2003-2007 y A1S_2088-2091) que codifican funciones de secreción potencialmente asociadas con el ensamblaje y adhesión de pili de tipo I (Smith et al. 2007, Eijkelkamp et al. 2014). El clúster AB57_2003-2007 se sobre-expresa, al igual que *CsuC* y *CsuD*, en las películas que forma *A. baumannii* ATCC17978 en la interfase aire-líquido (Martí et al. 2011). *CsuD* tiene alta homología con proteínas de *P. aeruginosa* con dominios involucrados en la biogénesis de pili y comparte un 40 y un 50% de homología con otras dos proteínas de membrana externa de *A. baumannii* ATCC17978 englobadas en los otros clústeres de pili de tipo I, A1S_1508 y A1S_2089, respectivamente (Tomaras et al. 2003, Eijkelkamp et al. 2011a). Las proteínas A1S_1507-A1S_1510 conforman otro operón que codifica para pili de tipo I involucrados en la formación de biopelícula sobre soportes sólidos (Rumbo-Feal et al. 2013). Este operón está conservado en *A. baumannii* (excepto en la cepa multirresistente a antibióticos AYE que presenta una secuencia de inserción interrumpiendo el gen que codifica para A1S_1508) y también se ha encontrado en otras especies del complejo ACB (Nait Chabane et al. 2014a). Los niveles de expresión de este operón (A1S_1507-A1S_1510) disminuyeron en presencia de hierro en películas formadas por *A. baumannii* ATCC17978 y aumentaron en un mutante del represor transcripcional global *hns*, sugiriendo un control por parte de la proteína H-NS (Eijkelkamp et al. 2011a, 2013). Además, el gen A1S_1507 incrementó considerablemente sus niveles de expresión en células de biopelícula en comparación con las células planctónicas en ATCC17978, al igual que ocurrió con los genes *csuC*, *csuD* y *csuA/B* (Rumbo-Feal et al. 2013). El clúster de 4 proteínas A1S_2088-A1S_2091 está extremadamente conservado en *A. baumannii* (excepto en la cepa multirresistente ACICU) y en otras especies como *A. pittii*, *A. nosocomialis* o *A. calcoaceticus* (Nait Chabane et al. 2014a), aunque su rol en la virulencia de *A. baumannii* aún no se ha descrito (Eijkelkamp et al. 2014). Al contrario, no se localizó ningún clúster semejante a *csu* en el genoma de la cepa sensible a antibióticos *A. baumannii* SDF ni en el genoma de la cepa ambiental *Acinetobacter baylyi* ADP1 (Vallenet et al. 2008, Eijkelkamp et al. 2014).

De la misma forma, diversos genomas de *A. baumannii* contienen genes que codifican para pili de tipo IV. En comparación con las cepas multirresistentes *A. baumannii* AYE y ACICU, *A. baumannii* ATCC17978 pierde tres genes involucrados en la adhesión de pili de tipo IV, mientras que *A. baumannii* SDF tampoco presenta la mayoría de los genes esenciales para la biogénesis y el funcionamiento de pili de tipo IV (Antunes et al. 2011).

Además de los pili de tipo I y IV, la producción de LPS o del polisacárido capsular también interviene en la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 además del pili de tipo IV (McQuery et al. 2012, Skiebe et al. 2012). Aunque los esfuerzos de Clemmer et al. (2011) fallaron en la identificación de un surfactante en *A. nosocomialis* M2 (Clemmer et al. 2011), se ha descrito en *A. baumannii* ATCC17978 la producción de 1,3-diaminopropano o DAP, la mayor poliamina en *Acinetobacter*, que es necesaria para la motilidad de ATCC17978 (Skiebe et al. 2012). La motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 puede ser inhibida mediante distintos compuestos extracelulares que producen estrés celular como el antimicrobiano triclosan, el etanol, la ampicilina y altas concentraciones de sal (Hood et al. 2010, McQuery et al. 2012, Nwugo et al. 2012). Se ha demostrado que la luz azul modula la motilidad de especies de *Acinetobacter* a través del gen *blsA* (Mussi et al. 2010, Bitrian et al. 2012, Golic et al. 2013), cesando la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 a bajas temperaturas (Mussi et al. 2010, Golic et al. 2013). La adición de rojo Congo, que inhibe la producción de exopolisacárido, así como el peróxido de hidrogeno, también alteraron la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 pero sin eliminarla por completo (McQuery et al. 2012). Mutantes del gen

sodB que codifica la enzima superóxido dismutasa putativa (SOD), también produjo defectos significativos en la motilidad de *A. baumannii* ATCCC17978, haciéndolos más susceptibles al estrés en comparación con la cepa parental (Heindorf et al. 2014). Los patrones de motilidad también son dependientes de la composición de los nutrientes del medio de cultivo en este patógeno (Barker y Maxted 1975, McQuery et al. 2012, Skiebe et al. 2012). Del mismo modo, un estudio reciente ha corroborado que varios aislados de *A. baumannii* presentan distinto patrón de motilidad asociada a superficie según el medio de cultivo (López et al. 2017).

Parece ser que el sistema de dos componentes GacSR, también está involucrado en la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978, ya que el mutante de la sensora quinasa *gacS*, que actúa como un regulador de virulencia global, presentó menor capacidad motil que la cepa parental, además de disminuir el nivel de expresión de los genes *csuD* y *csuB* del operón *csu*, pudiendo regular la síntesis de pili (Cerqueira et al. 2014).

2.2. Biopelícula en *Acinetobacter* spp.

Existen numerosos estudios que revelan la capacidad de *A. baumannii* de formar biopelícula sobre distintas superficies, tanto bióticas como sustratos abióticos hidrofílicos como el cristal o hidrofóbicos como el plástico, usado con frecuencia en el material médico, siendo la causa de infecciones nosocomiales tras la colonización de equipos e instrumentos médicos como catéteres urinarios, catéteres venosos centrales, tubos endotraqueales, etc..., representando un importante problema para pacientes inmunodeprimidos (Howard et al. 2012, Longo et al. 2014). Por definición, la biopelícula es una comunidad de células bacterianas asociadas con una superficie, tanto biótica como no biótica, dispuesta en una estructura tridimensional en la que las células se encuentran en contacto unas con otras y permanecen embebidas en una matriz extracelular que puede estar compuesta por carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas, que les ofrecen un papel protector frente a antibióticos (Costerton et al. 1999, Davenport et al. 2014, Sahu et al. 2014). *A. baumannii* ATCC19606^T forma más biopelícula sobre plásticos como poliestireno, polipropileno y Teflon que sobre el cristal borosilicato (Tomaras et al. 2003). Sin embargo, parece ser que *A. baumannii* presenta distintos mecanismos de adherencia según la superficie a la que se adhiera para colonizarla y formar biopelícula sobre ella. Se cree que la adherencia a superficies inanimadas o a superficies bióticas ocurre mediante mecanismos distintos, ya que no se correlaciona la formación de biopelícula de ATCC19606^T en células epiteliales o en plástico (de Breij et al. 2009). Eijkelkamp et al. (2011b) observaron distintos niveles de adhesión de *A. baumannii* ATCC17978 y de otro aislado de *Acinetobacter* sobre distintos sustratos biológicos (células epiteliales de pulmón y células de la nasofaríngea) (Eijkelkamp et al. 2011b).

La regulación de la formación de biopelícula es un proceso multifactorial que incluye una variedad amplia de señales ambientales y sensores como la disponibilidad de nutrientes y señales medioambientales, el QS, los sistemas de regulación de dos componentes y los reguladores transcripcionales (Gaddy y Actis 2009, Howard et al. 2012). Los factores ambientales como el pH, la temperatura o la sal también afectan a la producción de biopelícula (Pour et al. 2011). Toda esa red reguladora resulta en la producción de factores bacterianos como las proteínas de superficie celular (adhesinas, proteínas de membrana externa), y apéndices celulares (pili) que juegan un papel fundamental en la adhesión y posterior desarrollo de la biopelícula (Gaddy y Actis 2009, Howard et al. 2012).

Hasta la fecha se han descrito varios determinantes implicados en la formación de biopelícula de *Acinetobacter*. Entre los distintos factores reguladores que afectan a su

formación se encuentra la proteína Bap (*biofilm-associated protein*). Se trata de una proteína de superficie de membrana de 854 kDa con alta homología con la proteína asociada a biopelícula de estafilococos y que está bien conservada en el género *Acinetobacter* (Loehfelm et al. 2008). Bap está involucrada en las interacciones célula-célula que ayudan a las etapas del desarrollo, maduración y estabilización de la biopelícula sobre superficies inanimadas, ya que un mutante de *bap* resultó en la desestabilización de la biopelícula madura sobre superficies abióticas de cristal del aislado *A. baumannii* 307-0294 (Loehfelm et al. 2008). Apoyando su intervención en las últimas etapas del desarrollo de la biopelícula, los análisis con microscopía electrónica de barrido revelaron que la proteína Bap también es estrictamente necesaria para formar la arquitectura clásica de la biopelícula de *A. baumannii* 307-0294 que consiste en torres multidimensionales separadas por canales de agua en superficies médicas de polipropileno, poliestireno y titanio (Brossard y Campagnari 2012). Por el contrario, las células deficientes en esta proteína, permanecen predominantemente en una capa simple como si fuera una alfombra con escasas áreas de agregados celulares y sin formar estructuras tridimensionales. El mecanismo por el cual actúa Bap está aún por determinar y hasta el momento, no se han descrito ni factores ni condiciones ambientales que puedan controlar la diferente expresión del gen *bap*, aunque estos autores afirman que es posible que Bap se una a otras moléculas Bap de las células vecinas, funcionando como adhesinas intercelulares en la biopelícula y contribuyendo al soporte de la estructura e integridad del desarrollo de la biopelícula o que Bap se una a otra molécula de la biopelícula (Brossard y Campagnari 2012). Bap también aumenta la adherencia de *Acinetobacter* a células epiteliales de bronquios humanos y queratinocitos humanos de neonatos, probablemente por un aumento de la hidrofobicidad de las células bacterianas (Loehfelm et al. 2008).

En el caso de superficies abióticas de plástico y la interacción con células epiteliales humanas y filamentos de *Candida albicans*, también interviene la proteína de membrana externa OmpA (Choi et al. 2005, Gaddy et al. 2009). OmpA es una porina trimérica de 38 kDa, que presenta actividad emulsionante en especies de *Acinetobacter* degradadoras de aceites. Estas especies además producen una variedad de biosurfactantes de alto peso molecular como el emulsionante Alsan (AlnA) descrito en *Acinetobacter radioresistans* KA53 (Walzer et al. 2006). Este bioemulsionante está compuesto de proteínas y polisacáridos y es homólogo de la proteína OmpA (Walzer et al. 2006). Aunque OmpA presenta dominios transmembrana y está integrada como componente estructural de la membrana externa celular, estos autores observaron que la secreción de OmpA junto con la capacidad emulsionante podría ser importante fisiológicamente para la utilización de sustratos hidrofóbicos como fuentes de carbono y que constituye una característica de las cepas de *Acinetobacter* degradadoras de aceite (Walzer et al. 2006). Se ha observado que OmpA se secreta en cinco especies de *Acinetobacter* con esta capacidad de degradación, incluyendo la cepa ambiental *Acinetobacter* sp. ADP1 (Walzer et al. 2006) y por su condición de emulsionante, podría estar involucrada a su vez, en procesos de QS y formación de biopelícula (Ron y Rosenberg 2001). Además, OmpA induce la muerte de células epiteliales, provoca apoptosis temprana y necrosis retardada en células dendríticas, dirigiéndose a la mitocondria e induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (Lee et al. 2010).

Además de Bap y OmpA, la adhesina de superficie denominada autotransportador trimérico de *Acinetobacter* (Ata) también parece estar implicada en la adhesión y la formación de biopelícula (Betancor et al. 2012).

La capacidad de *A. baumannii* de interactuar célula-célula o célula-superficie también ha sido relacionada con distintas estructuras de tipo pili. Para las primeras etapas de formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC19606^T sobre superficies abióticas de plástico, que resultan en la formación de microcolonias y posterior desarrollo de la biopelícula, es esencial el operón *csu*. Mutaciones en los genes *csuC* y *csuE*, pertenecientes al operón, resultan en la supresión de adhesión a superficie y formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC19606^T y ATCC17978 (Tomaras et al. 2003, Chen et al. 2017). La mutación en el gen *csuD* que codifica una proteína de membrana exterior necesaria para la biogénesis de fimbrias, también genera defectos en la biopelícula de *A. nosocomialis* M2 (Clemmer et al. 2011). Además, el operón *csu* se sobre-expresa en células formadoras de biopelícula en comparación con células sésiles en *A. baumannii* ATCC17978 (Rumbo-Feal et al. 2013). Por el contrario, se ha demostrado que *A. baumannii* ATCC19606^T no necesita de este operón para adherirse a células epiteliales alveolares humanas, ya que la mutación del gen *csuE* produce la misma biopelícula sobre ellas (de Breij et al. 2009).

Se han descrito dos tipos de apéndices celulares utilizados por *A. baumannii* ATCC19606^T para adherirse al sustrato: 1) extensiones celulares largas e irregulares que conectan las bacterias, constituidas por los pili que produce el operón *csu*, observados también por Tomaras et al. (2003), y 2) estructuras de tipo pili cortas y delgadas que contactan con el área de la superficie adyacente a las células bacterianas (de Breij et al. 2009). Estos mismos autores demostraron que solo los pili cortos independientes del operón *csu* están involucrados en la adherencia de *A. baumannii* ATCC19606^T a células respiratorias al igual que describieron otros autores (Lee et al. 2006, de Breij et al. 2009). Sin embargo, Eijkelkamp et al. (2011b), en paralelo con los estudios publicados anteriormente (Tomaras et al. 2003), no pudieron establecer ninguna correlación entre la presencia o ausencia de otros clústeres de pili de tipo I y la adherencia de *Acinetobacter* a sustratos bióticos o abióticos (Eijkelkamp et al. 2011b).

Adicionalmente, algunos autores sugirieron que para la formación de biopelícula se necesitan múltiples sistemas de pili para mantener su estructura cohesiva, ya que un mutante de la proteína A1S_1507 que codifica para pili de tipo I, sobre-expresada en células de biopelícula en comparación con células planctónicas y englobada en el operón A1S_1507-A1S_1510, produjo una disminución de la formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978, al igual que un mutante de PilW (A1S_3168) necesario para el ensamblaje de pili de tipo IV (Rumbo-Feal et al. 2013).

La expresión del operón *csu* a su vez está controlada por el sistema de dos componentes BfmSR, que puede detectar moléculas del ambiente extracelular. La mutación del receptor *bfmR* provocó una pérdida de la expresión de *csu* y la consecuente menor producción de pili y formación de biopelícula en superficies plásticas (Tomaras et al. 2008). Sin embargo, el mutante de la sensora *bfmS* tan solo resulta en la atenuación y no en la inhibición total de biopelícula en *A. baumannii* ATCC19606^T, indicando que otros estímulos o moléculas ambientales pueden estar controlando la formación de biopelícula vía BfmSR (Tomaras et al. 2008). De hecho, cuando no se expresa el sistema BfmSR, la composición del medio de cultivo y la interacción entre células y la superficie abiótica juegan un papel importante (Tomaras et al. 2008).

Recientemente se ha descrito otro sistema de dos componentes en *A. baumannii* ATCC17978, el sistema CheA/Y relacionado con la motilidad y formación de biopelícula (Chen et al. 2017). En *A. baumannii* un mutante de *cheA* produce inhibición de motilidad de superficie, de película en la interfase aire-líquido y de biopelícula mediante la regulación del operón *csu* y del operón de QS (Chen et al. 2017).

Los factores ambientales también intervienen en la regulación de la biopelícula de *Acinetobacter* incluyendo la monitorización de la densidad bacteriana o QS, la presencia de nutrientes y la concentración de cationes metálicos libres (Gaddy y Actis 2009), algunas de ellas mediadas por los sistemas de dos componentes. La limitación de la concentración de hierro en el medio de cultivo mejora la formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC19606^T sobre superficies plásticas (poliestireno) (Tomaras et al. 2003). La luz azul inhibe a bajas temperaturas la formación de biopelícula en cristal y superficies bióticas en *A. baumannii* ATCC17978, sin embargo, a 37°C la biopelícula se desarrolla de manera independiente de la luz, indicando que la temperatura también es un factor a tener en cuenta para este proceso (Mussi et al. 2010). De hecho, al igual que la concentración de hierro extracelular, la temperatura de crecimiento es importante para la interacción con el hospedador, ya que en presencia de agentes quelantes de hierro algunos aislados de *A. baumannii* presentan una reducción significativa en la adhesión y capacidad de formar biopelícula en superficies bióticas y abióticas (Lee et al. 2006, 2008). La presencia de etanol también puede afectar la formación de biopelícula en *A. baumannii* (Smith et al. 2007).

Los mecanismos de resistencia convencionales como las β -lactamasas en el cromosoma, las bombas de expulsión de antibióticos y las mutaciones en moléculas diana de antibióticos también contribuyen a la supervivencia de las biopelículas en *Acinetobacter* (Gurung et al. 2013). Asimismo, la resistencia a distintos antibióticos es significativamente mayor entre aislados de *A. baumannii* productores de biopelícula que entre los no productores, como reveló un estudio con 60 aislados clínicos (Gurung et al. 2013). Hay que añadir que existe una correlación entre resistencia a antibióticos y la capacidad de adherirse a superficies. De este modo, otros determinantes genéticos aparecen involucrados en el proceso multifactorial de la formación de biopelícula. Aislados de *A. baumannii* que presentan el gen *bla_{PER-1}* que codifica para una β -lactamasa prevalente en aislados de *Acinetobacter* resistentes al antibiótico cefepime, mostraron mayor capacidad de adherencia a células epiteliales de bronquios y superficies plásticas y mayor formación de biopelícula, en comparación con aislados que no presentan este gen (Lee et al. 2008). Además, el nivel de expresión de *bla_{PER-1}* está correlacionado positivamente con esta capacidad de formar biopelícula aunque los mecanismos de adherencia a estas células epiteliales están aún sin elucidar. Por el contrario, Rao et al. (2008) detectaron que solo 2 de 11 aislados que presentan *bla_{PER-1}* forman biopelícula robusta comparado con aislados que no lo tienen, cuestionando la relevancia del mismo en la formación de biopelícula.

2.2.1. Composición de la biopelícula de *Acinetobacter* spp.

Numerosos aislados clínicos y ambientales del género *Acinetobacter* producen exopolisacáridos que constituyen el componente principal de las biopelículas en *A. baumannii* (Lee et al. 2008). Vidal et al. (1996) observaron que un aislado clínico de *A. baumannii* forma biopelículas en cubreobjetos de vidrio con un material amorfo similar al exopolisacárido cubriendo las células sésiles (Vidal et al. 1996). En *A. baumannii* ATCC19606^T, estos exopolisacáridos se encuentran formando parte de los agregados celulares que forma este patógeno al adherirse a superficies plásticas (Tomaras et al. 2003). Como ya se mencionó, uno de los polisacáridos más importantes es el PNAG codificado por el locus *pgaABCD*. Su función parece ser como la de una adhesina intercelular en la biopelícula (Choi et al. 2009). La producción de este polisacárido compuesto por un ratio 40:60 de GlcNH₂ y GlcNAc es esencial para la formación de la biopelícula, ya que deleciones en el locus *pga* conllevan a la pérdida de la consistencia de la biopelícula en *A. baumannii* S1, que es restaurada mediante complementación

(Choi et al. 2009). En la matriz también se sintetizan otros polisacáridos como el alginato y el núcleo del LPS, producidos por el gen *algC* que codifica para una enzima bifuncional en *A. baumannii* AIIIMS7 (Sahu et al. 2014). El alginato juega un papel esencial en la consolidación de la biopelícula y en la adhesión tanto en *Acinetobacter* como en otros patógenos como *P. aeruginosa* (Sahu et al. 2014). La adhesión mediante sensores de superficie podría ser un desencadenante crucial para la activación del promotor de *algC*, ya que hay una sobre-expresión del mismo en células de biopelícula en comparación con células planctónicas (Sahu et al. 2014). El sistema de glicosilación también aumenta la capacidad de formar biopelícula, promueve la adherencia y mejora la maduración de la masa y densidad de la biopelícula (Iwashkiw et al. 2012). El polisacárido capsular y las *O*-glicoproteínas son dependientes de la actividad de la glicosiltransferasa PglC en *A. baumannii* (Lees-Miller et al. 2013). La mutagénesis en *pglC* previene la síntesis de glicoproteínas y la cápsula, resultando en la formación de estructuras de biopelícula anormales y una virulencia atenuada en ratones (Lees-Miller et al. 2013). El mutante del gen *pgIL* que codifica para una oligosacariltransferasa, también resulta en una deficiencia en glicoproteínas y produce biopelículas significativamente menores, implicando a las glicoproteínas en las etapas iniciales, como la adherencia (Iwashkiw et al. 2012).

Las matrices extracelulares están constituidas en gran parte por ADN extracelular (ADNe), pudiendo suponer en otros patógenos como *P. aeruginosa* hasta más de un 50% de la matriz de biopelículas (Steinberger y Holden 2005). En aislados de *Acinetobacter* como *A. baumannii* AIIIMS7 y *A. baumannii* J9 también se ha demostrado que el ADNe es importante para la producción de biopelícula (Sahu et al. 2012, Wang et al. 2014). Además, biopelículas preformadas en *Acinetobacter* fueron disgregadas por DNaseI, al igual que ocurre en *P. aeruginosa*, apoyando la importancia del ADNe en el mantenimiento de la estructura de la matriz (Whitchurch et al. 2002, Sahu et al. 2012). Aunque se ha descrito que en patógenos como *P. aeruginosa* una parte del ADNe que se origina depende del QS (Allesen-Holm et al. 2006), no se descarta la posibilidad de que suceda lo mismo en *A. baumannii*.

2.2.2. Actividad antibiopelícula

Debido a su papel crucial en la supervivencia y dispersión de este patógeno, existe un enorme interés en la identificación de sustancias capaces de inhibir la formación de biopelícula.

Se han evaluado numerosos antimicrobianos como candidatos con capacidad antibiopelícula contra *Acinetobacter* tanto *in vivo* como *in vitro*. Los antibióticos rifampicina e imipenem, usados individualmente o de forma combinada, producen inhibición de biopelícula e inhibición de producción del ADNe en aislados clínicos de *A. baumannii*, al mismo tiempo que inhibe los cultivos planctónicos (Wang et al. 2014). También se ha demostrado la prevención de la formación de biopelícula de *A. baumannii* 2021 con catéteres recubiertos de antibiótico (Jamal et al. 2014). El 3',5'-diguanylate cíclico o c-di-GMP es un mensajero secundario altamente conservado necesario para la formación de biopelículas (Sambanthamoorthy et al. 2014). Varios inhibidores de c-di-GMP presentaron actividad antibiopelícula y antiadherencia sobre superficies abióticas contra el aislado *A. baumannii* AB5711 sin afectar al crecimiento planctónico. Sin embargo, a concentraciones mayores de 200 μ M presentaron toxicidad celular en células de mamíferos (Sambanthamoorthy et al. 2015). Por otra parte, algunos péptidos antimicrobianos presentaron actividad antibiopelícula y antibacteriana contra 19 cepas multirresistentes a antibióticos de *A. baumannii* (Gopal et al. 2014), al igual que pequeños péptidos solos o utilizados sinérgicamente con antibióticos, inhibieron la

producción de biopelícula de un aislado clínico de *A. baumannii* (Reffuveille et al. 2014). El uso de geles para heridas con agentes antimicrobianos como la enzima antibiopelícula DispersinB® que inhibe la formación de biopelícula y la dispersa, también la hace más susceptible al péptido antimicrobiano KSL-W en varios patógenos incluyendo *A. baumannii* (Gawande et al. 2014). Los desinfectantes comunes como la lejía matan bien la biopelícula de *A. baumannii*, sin embargo otros como el etanol, el peróxido de hidrógeno o el Lysol®, reducen considerablemente el número de células pero sin llegar a aniquilarlas (Orsinger-Jacobsen et al. 2013). El tratamiento con calor o radiación UV también produce un descenso significativo de UFCs (unidades formadoras de colonias) en la biopelícula de *A. baumannii*, pero la población bacteriana no se erradica por completo, sugiriendo que el material extracelular actúa como un escudo contra las condiciones de estrés (Orsinger-Jacobsen et al. 2013). Los catéteres venosos centrales producen a veces infecciones de la sangre generalmente relacionadas con morbilidad alta, causando grandes costes médicos y largas estancias hospitalarias (Cobrado et al. 2013). Como alternativa a catéteres antisépticos y recubiertos de antibióticos, se ha propuesto también la utilización de catéteres biocompatibles recubiertos con compuestos de bajo coste con actividad antibiopelícula, como el nitrato de cerio, el quitosán y en especial el hamamelitannin, un tanino extraído del arbusto conocido como avellano de bruja *Hamamelis virginiana*, los cuales inhiben la biopelícula *in vivo* de *A. baumannii* ATCC19606^T (Cobrado et al. 2013). El recubrimiento de catéteres urinarios con nuevas generaciones de desinfectantes, como el dihidrocloruro de octenidina, también inactiva la biopelícula de *A. baumannii* produciendo la muerte celular de este patógeno en la biopelícula (Narayanan et al. 2016). El agente quelante de iones EDTA causó entre un 55-65% de reducción de la biopelícula en el aislado *A. baumannii* 1656-2, al igual que una disminución de las células colonizadoras (Lee et al. 2008). También podrían usarse enzimas que disuelven la matriz contra *Acinetobacter* ya que hay estudios acerca de la inhibición de la biopelícula con enzimas como la DNasaI, la F-actina, o la alginato liasa, que disuelven la matriz extracelular y en último término afectan a la biopelícula de *P. aeruginosa* (Høiby et al. 2010). La virstatina también inhibe la biopelícula de *A. baumannii* produciendo un descenso drástico del pili de tipo IV (Nait Chabane et al. 2014b). Sin embargo, en un estudio se observó una sobre-expresión de los polisacáridos de las biopelículas formadas por *A. baumannii* ATCC17978 y otros aislados clínicos, como efecto compensatorio al añadir esta molécula (Nait Chabane et al. 2014b). La formación de biopelícula de *A. nosocomialis* ATCC17903^T también se vio afectada por la virstatina, mediante la inhibición del receptor de AHLs *anoR* (Oh y Choi 2015). Recientemente otros autores observaron el mismo efecto compensatorio en *P. aeruginosa*, demostrando que una delección de pili de tipo IV resulta en una reducción de la biomasa de la biopelícula y de las películas de la fase aire-líquido y a su vez, en una sobreproducción del polisacárido Psl en las microcolonias (Wang et al. 2013).

La estructura nanomolecular de las superficies también juega un papel fundamental en la adherencia de patógenos, de modo que el control nanomolecular de las superficies es un campo amplio de desarrollo para el control de biopelícula de patógenos como *P. aeruginosa* (Magennis et al. 2015, Hook et al. 2012).

Además, los inhibidores del sistema de adquisición de hierro podrían ser prometedores contra la biopelícula de *A. baumannii* ya que el metabolismo de hierro y la formación de biopelícula están íntimamente relacionados (Gentile et al. 2014). Los 2-aminoimidazoles también son agentes anti-biopelículas que tienen como diana el regulador de respuesta BfmR (Thompson et al. 2012).

3. Quorum sensing (QS)

Numerosas bacterias patógenas regulan sus genes de virulencia dependiendo de la densidad celular, a través del sistema de comunicación denominado *quorum sensing* (QS) (Rutherford y Bassler 2012). Este fenómeno fue descrito en los años 70 en bacterias marinas bioluminiscentes y es definido como el mecanismo de comunicación intercelular que permite a las poblaciones bacterianas actuar de forma coordinada mediante la regulación de la expresión génica dependiente de la densidad celular (Fuqua et al. 1994). Numerosas funciones bacterianas como el crecimiento en enjambre o anillos (*swarming*), la transferencia de plásmidos conjugativos, la movilidad, la biosíntesis de antibióticos, la luminiscencia, la producción de sideróforos, la expresión de genes de virulencia, la formación de endosporas o el mantenimiento y producción de biopelículas, son controladas mediante sistemas de QS (Swift et al. 2001, Waters y Bassler 2005, Williams et al. 2007).

En el proceso de QS, las bacterias liberan al medio extracelular pequeñas moléculas señal denominadas autoinductores (AIs), que se acumulan de forma proporcional a la densidad celular. Mediante biosensores específicos para estas señales, las bacterias pueden detectar la concentración celular en el medio que las rodea y cuando la cantidad de moléculas señal alcanza un determinado umbral o un quórum mínimo de células, se desencadena una variación en la expresión génica de forma coordinada en la población, alterando su comportamiento en respuesta a cambios en el número y/o las especies presentes en la comunidad (Waters y Bassler 2005). Aunque este proceso fue descrito por primera vez en *Streptococcus pneumoniae* (Tomasz y Hotchkiss 1964), la investigación que aclaró de forma detallada el sistema de QS, conduciendo a la identificación de la señal autoinductora y de los genes responsables, fue el estudio de la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Nealson 1977, Nealson y Hastings 1979), simbiote del calamar *Euprymna scolopes* y responsable de su bioluminiscencia.

Las primeras señales descubiertas en bacterias Gram-negativas fueron las señales *N*-acil homoserín lactonas (AHLs), en las cuales el proceso de QS está más estudiado. Las señales de QS o AIs más conocidos se pueden agrupar en tres categorías (Figura 1):

1. *N*-acil homoserín lactonas (AHLs)
2. Moléculas de naturaleza peptídica
3. Autoinductor AI-2

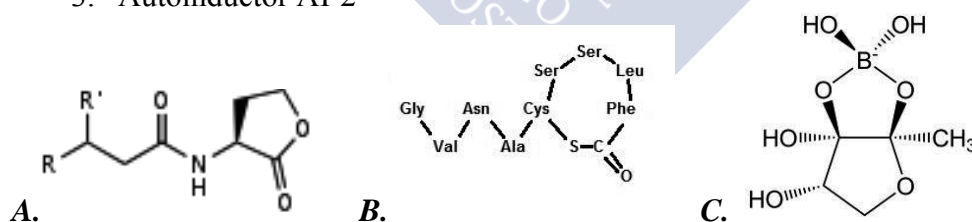


Figura 1. Estructura química de las principales moléculas señal de QS. A) AHLs, B) Péptidos autoinductores (AIPs) y C) autoinductor AI-2.

1. Las bacterias Gram-negativas normalmente producen AHLs y están involucradas en la regulación de un gran rango de funciones biológicas (Dong et al. 2001). Estas señales están compuestas por un anillo lactona (HSL) unido mediante un enlace amida a una cadena lateral, formada por un ácido graso que difiere según la especie. Generalmente esta cadena lateral está constituida por entre 4 y 18 carbonos, puede ser saturada o insaturada y en el tercer carbono puede tener o no sustituciones oxo- o hidroxil- (Whitehead et al. 2001). Estas moléculas fueron observadas por primera vez en bacterias marinas bioluminiscentes del género *Vibrio*, donde controlan los procesos de emisión de luz y constituyen el paradigma del QS en la mayoría de las bacterias Gram-negativas (Waters y Bassler 2005). Cada AHL en principio activa su receptor

correspondiente, sin embargo, algunas muestran mayor inespecificidad. La unión de la AHL y sensor permite a este último unirse a los promotores para activar o reprimir la expresión de genes diana controlados por QS. Aunque inicialmente fueron descritas como exclusivas de un pequeño número de Proteobacterias (Fuqua y Greenberg 2002, Williams et al. 2007), se ha descrito la producción de AHLs en la cianobacteria colonial *Gloeothece* (Sharif et al. 2008) y en diferentes Bacteroidetes marinos (Huang et al. 2008, Romero et al. 2010), lo que refuerza el importante papel de los sistemas de QS en las poblaciones naturales. Recientemente también se ha descrito producción de AHLs en la cepa Gram-positiva *Exiguobacterium* MPO (Biswa y Doble 2013).

2. En bacterias Gram-positivas el QS es mediado mayoritariamente por pequeños péptidos autoinductores o AIPs. Se trata de péptidos a menudo modificados post-traduccionalmente, de bajo peso molecular, de entre 5 y 34 residuos de aminoácidos y con una estructura bastante compleja. Presentan gran especificidad y necesitan un transportador específico ya que no difunden libremente a través de la membrana plasmática. Los mecanismos mediados por estas moléculas son más complejos que los de Gram-negativas, pues estos AIPs operan a través de un sistema de señalización de dos componentes uniéndose a receptores de membrana de tipo histidina quinasa que transmiten la señal mediante una cascada de fosforilación (Waters y Bassler 2005).

3. El tercer tipo de autoinductor, conocido como AI-2 (autoinductor 2), es utilizado tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Por ello, es considerado un sistema de comunicación interespecífica universal entre bacterias (Miller y Bassler 2001, Waters y Bassler 2005). AI-2 es un diéster furanosil borato, identificado por primera vez en *V. harveyi*. El gen que produce esta molécula se encuentra aproximadamente en 60 especies, donde se incluyen miembros de *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, además de géneros pertenecientes a los grupos *Deinococcus*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) y bacterias verdes del azufre (Romero 2010). Sin embargo, no ha sido posible relacionar esta señal con el control poblacional de la expresión génica en diversas especies, por lo que su papel como AI ha sido cuestionado (Williams et al. 2007).

Actualmente se conocen otros AIs de naturaleza diferente presentes sólo en ciertos tipos de bacterias incluyendo las γ -butirolactonas en *Streptomyces* y *Xanthomonas* (Ohnishi et al. 1999, Winans y Bassler 2002), los dipéptidos cíclicos (CDPs) y la 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona o señal quinolona de *Pseudomonas* (PQS) (Swift et al. 2001) y su precursor la 2-heptil-4(1H)-hidroxiquinolona (HHQ) en especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp. (Dubern y Diggle 2008), el metil-éster del ácido 3-hidroxi palmítico (3OH PAME) (Flavier et al. 1997), el factor señal difusible (DSF) de *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia cenocepacia* y *Xylella fastidiosa* (Barber et al. 1997, LaSarre y Federle 2013) o el AI-3 (autoinductor 3), una molécula aromática producida por bacterias de la microbiota intestinal humana (LaSarre y Federle 2013).

El primer sistema biológico regulado por QS en Gram-negativos fue descrito en *V. fischeri* (Nealson y Hastings 1979) para el control de la producción de bioluminiscencia de esta bacteria marina y constituye el paradigma de los sistemas de QS mediado por AHLs en estas bacterias. Este sistema de QS está constituido por dos proteínas, LuxI que sintetiza el AI y el receptor citoplasmático de la AHL específica LuxR (Figura 2). Ambos regulan la expresión del operón *lux* necesario para la producción de luz. Cuando la AHL se une a LuxR, este sensor de respuesta activa la transcripción del operón dependiendo de la densidad celular. La familia de proteínas LuxI, presenta una baja homología entre ellas (por debajo del 35%) y sintetizan AHLs específicas para cada especie y con variaciones en la cadena lateral. En *V. fischeri*, los genes que emiten bioluminiscencia en la bacteria se encuentran organizados en el operón *lux*

(*luxICDABEG*) que posee una región reguladora llamada *lux box* (Stevens y Greenberg 1997) donde se encuentra el sitio de unión a LuxR. El gen *luxI* codifica una proteína que sintetiza el autoinductor *N*-oxohexanoil-L-homoserín lactona (OC6-HSL) a partir de *S*-adenosil metionina (SAM) y proteínas portadoras de ácidos grasos y el resto de los genes del operón están involucrados en la producción de luz.

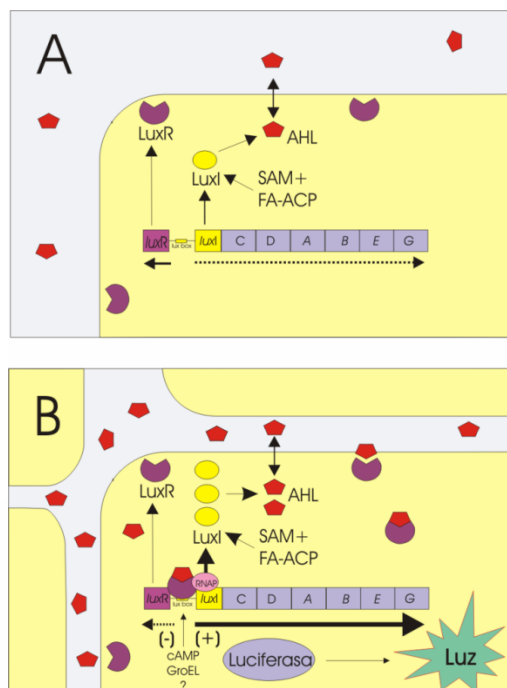


Figura 2. Modelo de detección de QS mediante producción de AHLs en *V. fischeri*. A) A bajas densidades, *luxR* se transcribe en el interior de la célula bacteriana (área amarilla) pero la transcripción del operón *lux* es baja, produciéndose una baja cantidad de AHL (pentágonos) y la ausencia de luz. B) A altas densidades celulares, la concentración de AHL aumenta en el medio, alcanza un umbral determinado y se une al receptor LuxR, activándose la transcripción del operón *lux*, la síntesis de luciferasa, el aumento de la producción de AHL por LuxI (autoinducción) y la emisión de bioluminiscencia. Imagen tomada de Romero 2010, con el permiso del autor.

3.1. QS en *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter presenta el típico sistema de QS LuxI/LuxR mediado por AHLs. Este sistema ha sido estudiado principalmente en *A. baumannii* M2, reclasificada recientemente como *A. nosocomialis* M2 (Carruthers et al. 2013), en la que el sistema de QS está constituido por la sintasa de AHLs AbaI, la única sintasa descrita hasta el momento, y el receptor AbaR (Niu et al. 2008, Bhargava et al. 2010). Se pueden encontrar genes homólogos a *abaI* y a *abaR* en *A. baumannii* ATCC17978 (Smith et al. 2007, Niu et al. 2008) y en otras especies de *Acinetobacter* (Bitrian et al. 2012, How et al. 2015). En la cepa tipo de *A. nosocomialis* ATCC17903^T la sintasa y el receptor de AHLs, que están organizados del mismo modo, se nombraron como *anoI* y *anoR* y en *A. baumannii* sp. DR1 fueron descritos como *aqsI* y *aqsR* (Kang y Park 2010a, Oh y Choi 2015). Hay que destacar que la sintasa *abaI* (A1S_0109) activa fuertemente un operón de siete u ocho genes relacionado con la producción de las señales de QS (A1S_0112-A1S_0118/A1S_0119) (Figura 3), y con la misma organización, tanto en *A. baumannii* ATCC17978 como en *A. nosocomialis* M2 (Clemmer et al. 2011, Giles et al. 2015) y en otras especies de *Acinetobacter* (Fournier et al. 2006, Vallenet et al. 2008, Adams et al. 2008, Kang y Park 2010a, Allen y Gullik 2014, How et al. 2015).

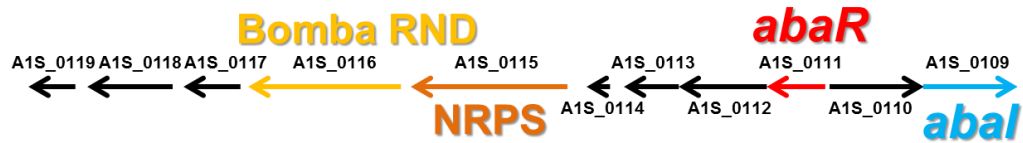
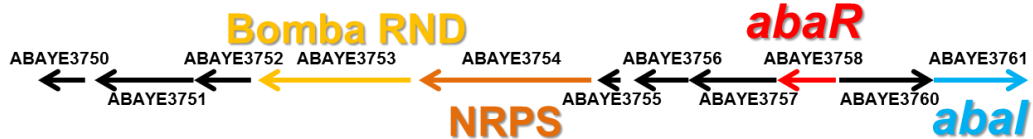
A. baumannii ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2*A. baumannii* AYE*A. baumannii* SDF

Figura 3. Organización del operón de QS (A1S_0111-A1S_0118/A1S_0119) en *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 (Clemmer et al. 2011, Giles et al. 2015), *A. baumannii* AYE (multirresistente a antibióticos) y *A. baumannii* SDF (sensible a antibióticos) (Vallenet et al. 2008). NRPS (*non-ribosomal peptide synthase*): sintasa de péptidos no ribosomales. Bomba RND: bomba de expulsión de la familia RND (*resistance-nodulation-cell division*).

Los genes A1S_0112 y A1S_0113 del operón de QS que codifican para una acil-CoA sintetasa y una acil-CoA dehidrogenasa, respectivamente, son necesarios para la activación del gen A1S_0114. Este gen que codifica una pequeña proteína transportadora de acilos o ACP (*acyl carrier protein*) esencial para la síntesis de AHLs, es expresado exclusivamente en biopelículas de *A. baumannii* ATCC17978 e inhibido totalmente en células planctónicas (Rumbo-Feal et al. 2013). En un mutante de la proteína transportadora de acilos A1S_0114, se observó una disminución considerable de los genes A1S_0112 y A1S_0113, así como de la sintasa *abaI* (A1S_0109) mediante ensayos de PCR cuantitativa (Rumbo-Feal et al. 2013). Las secuencias completas de los genomas de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 parecen indicar que la sintasa *abaI* y los genes del operón de QS son los únicos involucrados en la síntesis de AHLs (Smith et al. 2007, Carruthers et al. 2013). En un trabajo más reciente, un mutante de A1S_0114 también mostró una reducción en la adherencia celular y virulencia en tres modelos animales, junto con una reducción de los niveles de expresión de la proteína de membrana externa OmpA (Rumbo-Feal et al. 2017). Sin embargo, no se correlacionaron estos fenotipos con la ausencia de señales de QS, que no han sido estudiados en este patógeno. Además, en un mutante del gen A1S_0114 no detectaron presencia del metabolito secundario denominado acinetin 505 (Ac-505), un lipopéptido de 505 Da identificad en *A. baumannii* ATCC17978, asociando este gen con la producción de Ac-505 e indicando que es crítico para la patogenicidad de *A. baumannii* (Rumbo-Feal et al. 2017). Aunque ya se había propuesto que el operón de QS podía estar involucrado en la biosíntesis de un metabolito secundario sin caracterizar, como un lipopéptido no ribosomal (Clemmer et al. 2011, Eijkelkamp et al. 2013, 2014, Giles et al. 2015), el mecanismo de actuación de este lipopéptido está por elucidar (Rumbo-Feal et al. 2017). El gen A1S_0115 codifica una pequeña sintasa de péptidos no ribosomales o NRPS (*non-ribosomal peptide synthase*) que se encuentra

acoplada con una bomba de expulsión de antibióticos (A1S_0116) de la familia de transportadores RND en el operón de QS (Vallenet et al. 2008). Las NRPS excretan una amplia gama de productos naturales como toxinas, sideróforos, antibióticos o pigmentos y podría estar involucrada en la secreción de metabolitos secundarios codificados por el operón de QS (Rumbo-Feal et al. 2017). En otros patógenos como *P. aeruginosa*, ya se han relacionado los sistemas de eflujo con el QS. Un ejemplo es el del sistema MexAb-OprM, que selecciona específicamente las AHLs de *P. aeruginosa* expulsando fuera de la célula las AHLs que no son específicas del receptor LasR de este patógeno (Minagawa et al. 2012). Hasta el momento, sin embargo, no ha sido confirmada la relación de la actividad de esta bomba presente en el operón de QS de *A. baumannii* ATCC17978 con la producción y/o expulsión de señales. Los genes A1S_0117 y A1S_0118 codifican para proteínas anotadas con función desconocida (Smith et al. 2007), aunque se han relacionado por homología con una porina y una epimerasa/dehidratasa, respectivamente. El último gen de este operón, A1S_0119, codifica para una transferasa de fosfopanteteína.

El género *Acinetobacter* es bien conocido por su versatilidad metabólica que le permite adaptarse a diferentes nichos ecológicos según el origen de la especie (Vallenet et al. 2008). La cepa multirresistente a antibióticos *A. baumannii* AYE (Figura 3), responsable del brote en 2001 en Francia contiene una gran isla de resistencia a antibióticos de 86 kb presente en la mayoría de los genomas publicados de *A. baumannii* (Fournier et al. 2006, Adams et al. 2010). Sin embargo, esta isla de resistencia no está presente en el genoma de la cepa asociada a piojos humanos y sensible a antibióticos *A. baumannii* SDF, explicando en cierta parte su mayor sensibilidad a drogas. Además, en la cepa SDF la región genética que contiene el operón de QS aparece interrumpida por una secuencia genética de inserción presentando una sintasa *abaI* no funcional (Figura 3) (Vallenet et al. 2008). Curiosamente, en la cepa ambiental aislada de suelo *A. baylyi* ADP1, esta región genética con el operón de QS está ausente (Vallenet et al. 2008).

Diversos estudios han descrito la generación de señales AHLs por el género *Acinetobacter* mediante distintos biosensores pero sin llegar a la caracterización química y precisa de las mismas. Especies nosocomiales y ambientales de *Acinetobacter* producen más de una señal de QS con distintos patrones en función de la especie, presentando la mayoría más de una señal de QS, denotando la no especificidad de la sintasa de AHLs, como apuntaron ya algunos autores (Niu et al. 2008, Bitrian et al. 2012). Varios autores identificaron la producción de 3-oxo y 3-hidroxi derivados de AHLs sin identificar específicamente las señales mediante métodos químicos. Sobrenadantes de la cepa medioambiental *A. calcoaceticus* BD413 y de dos aislados clínicos de *Acinetobacter* produjeron 4 señales detectables en cromatografía en capa fina con diferente patrón según la especie y el medio de cultivo (González et al. 2001). En sobrenadantes de *Acinetobacter junii* BB1A se detectaron 3-oxo y 3-hidroxi derivados de AHLs mediante el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (Sarkar y Chakraborty 2007). En otro trabajo, 43 cepas correspondientes a 20 especies distintas de *Acinetobacter* mostraron señales de QS agrupadas en tres grupos cromatográficos diferentes mediante cromatografía en capa fina y *A. tumefaciens* NT1, sin poder asignar ninguna de las tres a una especie en particular dentro del género y sin encontrar diferencia entre las señales producidas por las cepas típicamente oportunistas (complejo ACB) frente al resto (González et al. 2009). Por otra parte, Oh y Choi (2015), identificaron la producción de OHC12-HSL mediante biosensores en *A. nosocomialis* ATCC17903^T y en *Acinetobacter oleivorans* DR1, se identificaron hasta 3 señales mediante cromatografía en capa fina (Kang y Park 2010a, Kim y Park 2013). Otros

autores detectaron en 9 cepas ambientales y hospitalarias de *Acinetobacter* sp. AHLs de cadena larga, sin encontrar C4 o C6-HSL en ningún caso, sugiriendo un hecho distintivo de las cepas pertenecientes al complejo ACB (Bitrian et al. 2012). En otro trabajo con 55 aislados clínicos de *Acinetobacter*, se confirmó la presencia de sólo C10 y C12-HSL en 5 y 2 aislados, respectivamente, mediante análisis de espectrometría de masa (Anbazhagan et al. 2012). Un estudio reciente, sugiere que las especies de *Acinetobacter* aisladas de suelo usan diferentes señales que las nosocomiales para su comunicación. De este modo, mediante biosensores detectaron que las especies de *Acinetobacter* pueden usar OC8 y C8-HSL, mientras que C10, C12, C14 y C16-HSL solo fueron identificadas en aislados clínicos, sugiriendo que estas moléculas señal tienen un papel en la rápida adaptación de bacterias que proceden de fuentes de aislamiento distintas (Erdönmez et al. 2017).

Hasta el momento, solo se han identificado con exactitud las señales de QS en cuatro especies/aislados. En *A. nosocomialis* M2, tratado hasta ahora en la literatura como *A. baumannii* (Carruthers et al. 2013), se identificó mediante espectrometría de masas y tras la sobre-expresión de la sintasa *abaI* en *E. coli*, la señal OHC12-HSL como la mayoritaria, aparte de otras cinco AHLs adicionales en menores concentraciones (Niu et al. 2008). En la cepa ambiental *Acinetobacter* sp. GG2 se identificaron OHC12 y OC12-HSL mediante el uso de biosensores y posterior confirmación por LC-MS/MS (Chan et al. 2011, How et al. 2015) y en la cepa clínica multirresistente *Acinetobacter* 4KT, se identificaron C6 y C8-HSL con técnicas similares (Chan et al. 2014). En el aislado clínico *A. baumannii* S1 identificaron la OHC10-HSL mediante espectrometría de masas al sobre-expresar la sintasa en *E. coli* (Chow et al. 2014). Sin embargo, el perfil de señales de QS y los factores que controlan su producción aún no se han descrito ni caracterizado en ninguna cepa de referencia de *A. baumannii*.

El género *Acinetobacter* controla varias de sus funciones biológicas a través del mecanismo de QS, como la producción de enzimas antioxidantes como la catalasa y la SOD (Bhargava et al. 2014) y está involucrado en la biodegradación de hexadecanos, en el metabolismo de aminoácidos/carbohidratos y en la tolerancia a metales en biopelículas en otras especies de *Acinetobacter* (Sarkar y Chakraborty 2007, Kang y Park 2010ab, Kim y Park 2013). Se ha descrito la variación de fase en *A. baumannii* AB5075, mostrando dos fenotipos distintos de las colonias, opaco y translúcido (Tipton et al. 2015). Estos autores sugirieron que el QS también controla la variación de fase, pero mediante un factor extracelular acumulable distinto a OHC12-HSL e independiente de la sintasa de AHLs *abaI* (Tipton et al. 2015). Sin embargo, en otras cepas como *A. baumannii* ATCC17978, fueron incapaces de detectar variantes distintas de las colonias (Tipton et al. 2015).

Ya se ha demostrado que el QS mediado por AHLs, debe estar involucrado en el control de la motilidad en *A. nosocomialis* M2, debido a que el mutante de la sintasa *abaI* presentó disminución de la motilidad, la cual fue restaurada con la adición de su AHL mayoritaria, OHC12-HSL (Clemmer et al. 2011). El mutante de *anoR*, el receptor de AHLs identificado en *A. nosocomialis* ATCC17903^T, no mostró motilidad en comparación con la cepa silvestre (Oh y Choi 2015). Además, mutantes de los genes A1S_0112 y A1S_0115 del operón de QS (Figura 3) también presentaron fenotipos no motiles, además de ser esenciales para formar la película en la interfase aire-líquido que también está relacionada con fenotipos motiles, asociando el QS con la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 (Giles et al. 2015). Apoyando esta relación, deleciones en los genes A1S_0113 y A1S_0115 no presentaron motilidad en *A. nosocomialis* M2 (Clemmer et al. 2011). Del mismo modo, la mutación de A1S_0114 también reduce la

expresión de genes de clústeres de pili de tipo I (A1S_1510, A1S_1091) (Eijelkamp et al. 2011, 2013, Nait Chabane et al. 2014a), relacionando el QS con la motilidad.

En cuanto a la regulación del operón de QS, se ha postulado que el adenosín monofosfato cíclico o AMPc puede funcionar como un regulador de la motilidad en *A. baumannii* ATCC17978 a través del control directo o indirecto del operón de QS (Giles et al. 2015).

Una variante con fenotipo hipermotil de *A. baumannii* ATCC17978 (*A. baumannii* ATCC17978hm) que contiene interrumpido el gen *hns* codificante de una proteína reguladora de tipo histona (H-NS o *histone-like nucleoid structuring protein*), presentó un incremento significativo de la expresión de la sintasa y del receptor de AHLs *abaI* y *abaR*, además de los genes del operón de QS, en comparación con la cepa silvestre (Eijelkamp et al. 2013). Los autores de este trabajo sugirieron que el operón de QS en *A. baumannii* ATCC17978 podría ser una diana potencial para el regulador transcripcional global H-NS en la región *aguas arriba* (entre A1S_0111 y A1S_0112) de uno de los dos sitios reguladores con bajo porcentaje de GC que posee el operón (Eijelkamp et al. 2013).

Además, el sistema CheA/Y asociado con motilidad y formación de biopelícula (Chen et al. 2017), podría estar controlando el QS ya que los niveles de transcripción de *abaI* y otros genes del operón de QS y de *csu* disminuyen en el mutante de *cheA* y la biopelícula y la motilidad son restaurados cuando se añaden AHLs al mutante exógenamente, relacionando de nuevo el QS con ambos fenotipos (Chen et al. 2017).

Por otra parte, se ha sugerido que las señales de QS también pueden ser detectadas y monitorizadas por el sistema BfmRS (Gaddy y Actis 2009).

También se ha postulado que el gen *gacS* que codifica para la sensora quinasa del sistema GacSR que actúa como un regulador de virulencia global podría estar regulado por AHLs en *Acinetobacter* sp. DR1 (Kang y Park 2010a).

Contribuyendo a la importancia del QS en la motilidad del género *Acinetobacter*, un estudio observó la pérdida del fenotipo motil junto con la disminución de las señales de QS en variantes resistentes a distintos antibióticos de la cepa *Acinetobacter* sp. DR1, indicando que la adquisición de resistencia a antibióticos puede reducir la eficacia biológica (Kang y Park 2010b). En las distintas variantes se detectó mayor o menor presencia de apéndices en la superficie bacteriana como resultado de una menor o nula expresión de los genes relacionados con fimbrias de la superficie celular, según el antibiótico seleccionado, en concentraciones bajas (0,2%) y altas (0,5%) de agar, revelando un control distinto de los mecanismos de motilidad en función de las distintas resistencias y relacionando cada antibiótico con un grado distinto de alteración fenotípica y genética (Kang y Park 2010b). Sin embargo, los niveles de la expresión de la sintasa de AHLs de esta cepa, denominada *aqsI*, fueron similares, indicando que la disminución de las señales de QS podría verse afectada por otros factores, posiblemente relacionados con un cambio en la fluidez de la membrana que afectaría al flujo de las AHLs (Kang y Park 2010b). Del mismo modo, la presencia de concentraciones subinhibitorias del antibiótico estreptomycin, pero no de gentamicina o miomicina, resultó en una restricción de la motilidad en *A. nosocomialis* M2 a través de una inhibición directa de la producción de OHC12-HSL, a causa de la reducción de los niveles de expresión de la sintasa *abaI* y del gen A1S_0112 del operón de QS, necesario para la síntesis de AHLs (Saroj y Rather 2013).

Por otra parte, la virstatina, una pequeña molécula inhibidora de pili de tipo IV, afecta a la migración de *A. baumannii* ATCC17978 en superficie semisólida actuando sobre la biogénesis de pili (Nait Chabane et al. 2014b). Otros autores observaron efectos similares de la virstatina en *A. nosocomialis* ATCC17903^T pero a través de la inhibición

de la expresión del receptor de AHLs identificado en esta cepa como *anoR* (Oh y Choi 2015).

El sistema de QS dependiente de AHLs, también juega un papel clave en el control de la formación de biopelícula en *A. baumannii*. Al igual que en la motilidad, mutaciones en la sintasa de AHLs de *A. baumannii* S1, *A. baumannii* SS17, *A. nosocomialis* ATCC17903^T, *A. nosocomialis* M2 y *A. oleivorans* DR1, producen alteraciones de la formación de la biopelícula (Niu et al. 2008, Kang y Park 2010a, Anbazhagan et al. 2012, Bhargava et al. 2012, Chow et al. 2014, Oh y Choi 2015). El mutante del receptor de AHLs *aqsR* de *Acinetobacter oleivorans* DR1, también demuestra que este gen juega un papel importante en la formación de biopelícula (Kim y Park 2013).

Cabe destacar que el patrón de expresión de genes de *A. baumannii* es distinto entre células de la biopelícula y células planctónicas. En un estudio comparativo de *A. baumannii* ATCC17978 observaron que 1621 genes se sobre-expresan en la biopelícula, incluyendo los que conforman el operón de QS, 55 de los cuales se expresan solamente en las biopelículas (Rumbo-Feal et al. 2013). Otro estudio, demostró la asociación entre el QS y la formación de biopelícula en *A. baumannii*, demostrando que existe una correlación significativa entre el aumento de los niveles de expresión del gen *abaI* y el incremento de la biopelícula durante la transición de células planctónicas a células de biopelícula (He et al. 2015).

Además del caso ya mencionado de *Acinetobacter* sp. DR1, existen otros estudios que asocian la adquisición de resistencias a antibióticos con la pérdida del QS, ya que la exposición de *A. baumannii* ATCC17978 al antibiótico imipenem disminuyó la expresión de los genes involucrados en el QS, así como del operón *csu*, provocando al final una reducción de la formación de biopelícula (Chang et al. 2014). Sin embargo, otro trabajo correlacionó positivamente el sistema de QS con los genes de resistencia a antibióticos, ya que el mutante de la sintasa *abaI* de *A. baumannii* AbS presentó una disminución del gen de la bomba de eflujo *adeB*, al igual que *adeA* entre otros, mientras que al añadirle OHC12-HSL exógenamente aumentó la expresión de estos genes relacionados con resistencia a drogas (Dou et al. 2017).

A pesar de que cada vez *A. baumannii* ATCC17978 es más utilizada para el estudio de los determinantes de virulencia del género, hasta la fecha no se ha descrito en la bibliografía qué señales de QS produce. Ya que es evidente la contribución del sistema de QS al potencial de virulencia en el género *Acinetobacter*, uno de los objetivos de este trabajo fue investigar en *A. baumannii* ATCC17978 el perfil de moléculas de QS, la motilidad asociada a superficie, la formación de biopelícula y la relación entre estos dos factores de virulencia con el sistema de QS.

4. Quorum quenching (QQ)

Los mecanismos que causan la inactivación de la comunicación bacteriana mediados por señales de quórum, han sido denominados de forma genérica *quorum quenching* (QQ) (Dong et al. 2001, 2007), aunque algunos autores prefieren restringir este término a la degradación enzimática de las señales AHLs (Kjelleberg et al. 2008). Los procesos de QQ son de gran importancia, ya que pueden ser una buena y eficaz alternativa al tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por patógenos. Estos mecanismos evitan que las bacterias patógenas lancen su ataque, haciéndolas más sensibles a las defensas del hospedador y facilitando que puedan ser eliminadas con mayor eficacia. Un punto clave de las estrategias de QQ es que no afectan a la viabilidad de las bacterias, sino que sólo interfieren en la expresión de los factores de virulencia, evitando una presión selectiva sobre ellas, y por lo tanto, reduciendo la

generación de resistencia. Los mecanismos de QQ mejor conocidos son los referentes a los procesos en los que intervienen las AHLs.

A pesar de que el QQ enzimático es el más estudiado, el primer mecanismo de QQ descrito fue la inactivación no enzimática de QS desarrollada por el alga roja *Delisea pulchra*, que produce unas moléculas halogenadas denominadas furanonas, con una estructura química semejante a las AHLs (Givskov et al 1996). Estas furanonas antagonizan la señal compitiendo con las AHLs por la unión al receptor de tipo LuxR inhibiendo los procesos de QS mediados por AHLs y AI-2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Givskov et al. 1996). A pesar de que su eficacia ya ha sido demostrada para el tratamiento de enfermedades infecciosas en peces y crustáceos (Rasch et al. 2004, Defoirdt et al. 2006), el problema de su aplicación biotecnológica es su alta toxicidad, haciendo necesaria la identificación de otras sustancias alternativas tanto naturales como sintéticas.

4.1. Degradación enzimática de AHLs

La comunicación bacteriana puede ser bloqueada por la disminución de la concentración de AHL activa en el medio. La degradación de AHLs ocurre de forma espontánea por hidrólisis alcalina a pHs elevados (Yates et al. 2002), aunque también puede suceder mediante degradación enzimática, la estrategia de QQ más explorada hasta el momento. Dada la estructura química de las AHLs, la degradación enzimática de las mismas puede llevarse a cabo por cuatro tipos de enzimas diferentes: las lactonasas y descarboxilasas que hidrolizan el anillo HSL y las deaminasas y acilasas, que separan el ácido graso del anillo HSL por rotura del enlace amida (Romero et al. 2015).

Las lactonasas o AHL-lactonasas se han descrito en gran número de bacterias de origen terrestre. El primer enzima degradador de AHLs fue identificado en el género *Bacillus* (Dong et al. 2000), que es capaz de degradar las AHLs mediante la acción del gen denominado *aiiA* (*AutoInducer Inactivator*) que codifica para la enzima AiiA. En el género *Bacillus* ya se han descrito varias especies con estas lactonasas (Dong et al. 2000, Liu et al. 2008, Momb et al. 2008, Chen et al. 2010), que comparten una elevada homología entre ellas (mayor del 90%) a nivel de secuencia aminoacídica (Dong et al. 2002). Todas ellas están clasificadas dentro de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas ya que contienen en su secuencia un dominio de unión a zinc muy conservado en esta superfamilia (HXHXDH) además de otros residuos esenciales para la actividad de la enzima (Dong et al. 2002, Wang et al. 2004). La superfamilia de las metalo- β -lactamasas está constituida por alrededor de 6000 miembros hasta el momento y repartida en casi 20 familias, como las glioxilasas II, las *N*-acil homoserín lactonasas o AHL-lactonasas, las familias de proteínas involucradas en la maduración del ARNm y en la reparación del ADN incluyendo enzimas como las tiolesterasas, fosfodiesterasas u oxidoreductasas (Bebrone 2007). Todas ellas presentan características estructurales comunes como la estructura terciaria (plegamiento tipo $\alpha\beta\beta\alpha$), el dominio conservado HXHXDH (Bebrone 2007) y el requerimiento de dos sitios de unión a iones metálicos para llevar a cabo su actividad catalítica (Murphy et al. 2003, Bebrone 2007). Este dominio, junto con los otros residuos claves se coordinan con los iones de zinc para formar enlaces con las moléculas de agua involucradas en la vía hidrolítica (Murphy et al. 2003). Hasta la fecha, las lactonasas del género *Bacillus* han sido clonadas y expresadas en distintas bacterias -en *Erwinia carotovora*, en *Pseudomonas*, en *E. coli*. y en *Pichia pastoris* (Dong et al. 2001, Wang et al. 2004, Zhang et al. 2007, Chen et al. 2010, Cao et al. 2012), lo que ha permitido su estudio y la exploración de sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Lactonasas de AHLs pertenecientes a las metalo- β -

lactamasas también se encontraron en especies de *Arthrobacter* sp. (AhlD), *A. tumefaciens* (BlaC o AttM y AiiB), *K. pneumoniae* (AhlK), *Solibacillus silvestris* (AhlS), *Acidobacteria bacterium cosmid p2H8* (QlcA) y dos pertenecientes al grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*: AidC de *Chryseobacterium* sp. y Aii20J de *Tenacibaculum* sp. 20J (Zhang et al. 2002, Carlier et al. 2003, Park et al. 2003, Riaz et al. 2008, Wang et al. 2012, Morohoshi et al. 2012, Mayer et al. 2015).

Normalmente las bacterias capaces de degradar AHLs poseen uno o dos enzimas responsables de esta actividad, a excepción de *P. aeruginosa* que contiene varias acilasas y *Rhizobium* sp. NGR234 que posee hasta cinco enzimas de QQ, entre ellas dos lactonasas, DhIR y QsdR1 (Krysciak et al. 2011). En algunas bacterias coexisten actividades enzimáticas distintas como en *Deinococcus radiodurans* R1, *Hyphomonas neptunium* ATCC15444 y *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 (Kalia et al. 2011).

Por otra parte se han descrito otras lactonasas que no se encuentran dentro de las metalo- β -lactamasas (Romero et al. 2015). Entre ellas, varias lactonasas codificadas por un grupo de genes *bpiB* (BpiB01, BpiB04, BpiB06), que fueron aisladas de metagenomas de suelos y detectados en *Nitrobacter* sp. Nb-311A, *P. fluorescens* y *Xanthomonas campestris* (Schipper et al. 2009, Amara et al. 2011), son capaces de inhibir biopelículas de *P. aeruginosa* (Shipper et al. 2009). Además se han identificado otras lactonasas de la familia fosfotriesterasa como QsdA de *Rhodococcus erythropolis* W2 (Uroz et al. 2008), GKL, una lactonasa termoestable en *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (Chow et al. 2010), SsoPox en *Sulfolobus solfataricus* (Merone et al. 2005) y MCP de *Mycobacterium avium* (Chow et al. 2009). De la familia α/β hidrolasa se han descrito lactonasas como AidH de *Ochrobactrum* sp. T63 (Mei et al. 2010), AiiM de *Microbacterium testaceum* StlB037 (Wang et al. 2010) y recientemente se ha encontrado una α/β hidrolasa denominada AidA en varios aislados de *A. baumannii*, tras añadir la señal OC12-HSL a los cultivos (López et al. 2017). También se ha descrito la lactonasa QsdH perteneciente a la familia hidrolasa de tipo GDSL en un extremo de la proteína de expulsión transportadora de antibióticos de tipo RND en *Pseudoalteromonas byunsanensis* 1A01261 (Huang et al. 2012).

Por último existen una serie de enzimas de mamíferos denominadas paraoxonasas (PONs), PON1, PON2 y PON3, relacionadas con el metabolismo de fármacos (Dong y Zhang 2005), que son capaces de inactivar AHLs (Yang et al. 2005). Estudios de reactividad con distintos sustratos han demostrado que las PONs son capaces de hidrolizar lactonas, ésteres y fosfotriésteres usando el mismo sitio activo, pero su actividad principal parece que es de tipo lactonasa (Draganov et al. 2005, Khersonsky y Tawfik 2005). Las lactonasas PONs, sin embargo, no poseen el dominio conservado de las metalo- β -lactamasas y necesitan iones de calcio para su actividad (Billecke et al. 2000).

El segundo tipo de enzimas más estudiadas hasta ahora, las acilasas, que hidrolizan el enlace amida liberando el anillo HSL y el ácido graso, se observaron por primera vez en la bacteria Gram-negativa terrestre *Variovorax paradoxus*, capaz de degradar varias AHLs y utilizarlas como fuente de nitrógeno y energía (Leadbetter y Greenberg 2000). La actividad acilasa también se ha demostrado en otra Proteobacteria del suelo, *Ralstonia* sp., y el gen responsable de su actividad fue denominado AiiD (Lin et al. 2003, Taga y Bassler 2003). Se describieron genes homólogos a AiiD en otras especies del género *Ralstonia* y en *P. aeruginosa*, que posee tres acilasas (PvdQ, QuiP y HacB) (Huang et al. 2006, Sio et al. 2006, LaSarre y Federle 2013). Además se han descrito enzimas con actividad acilasa en *Streptomyces* sp. (AhlM) (Park et al. 2005), en *Anabaena* sp. PCC7120 (AiiC) (Romero et al. 2008), en *Shewanella* sp. (AaC)

(Morohoshi et al. 2008b), en *Comamonas* sp. (Uroz et al. 2007), en otras especies de *Ralstonia* (genes no determinados) (Lin et al. 2003) y en *Ochrobactrum* sp. A44 (AiiO) (Czajkowski et al. 2011).

Hay que añadir que las lactonasa tienen un amplio rango de degradación de señales de tipo AHL, mientras que las acilasas presentan una mayor especificidad de sustrato prefiriendo normalmente AHLs de cadena larga (10 carbonos o más) (LaSarre y Federle 2013, Romero et al. 2015). Existe una hipótesis que defiende que los genes codificadores de enzimas degradadoras de AHLs podrían estar conservados en muchos organismos procariontes (Romero et al. 2011a). Recientemente se ha demostrado que el medio marino es muy rico en bacterias con estrategias QQ, mucho más activas y abundantes en comparación con otros ambientes (Romero et al. 2011a, 2012, Muras et al. 2018a), en el cual podría proporcionarles a las bacterias ventajas adaptativas al menos en superficies como en biopelículas y nichos eucarióticos (Romero et al. 2012).

A parte de las actividades enzimáticas de tipo lactonasa y acilasa existen actividades oxidasa-reductasa en bacterias que son capaces de modificar la cadena acil de las AHLs. Esta actividad fue descrita por primera vez en *Rhodococcus erythropolis* W2 que usa como fuente de nitrógeno y energía las señales AHLs (gen no determinado) (Uroz et al. 2005). Esta actividad también se describió en *Bacillus megaterium* (monooxigenasa P450) (Chowdhary et al. 2007) y en un análisis metagenómico fue identificado el enzima dependiente de NADH (BpiB09) (Bijtenhoorn et al. 2011).

Por último, existe un mecanismo adicional descrito en el alga parda *Laminaria digitata* que consiste en la producción de HOBr por haloperoxidasas del alga, que reacciona específicamente con AHLs sustituidas en el tercer carbono inactivándolas (Borchardt et al. 2001).

A pesar de que se cree que la mayoría de los sistemas de inhibición de QS están involucrados en comportamientos competitivos entre bacterias, las enzimas degradadoras de AHLs también pueden funcionar como autorreguladores de sus propias señales de QS (Romero et al. 2015). La bacteria patógena *A. tumefaciens*, causante de tumores en las raíces de plantas, produce OC8-HSL (oxooctanoil homoserín lactona) para controlar la transferencia horizontal del plásmido Ti, inductor del tumor en la planta, que transporta el ADN-T y los genes de virulencia. Los genes ADN-T codifican la síntesis de compuestos específicos denominados opinas, las cuales la bacteria usa como fuente de nitrógeno y carbono. Adicionalmente, algunas opinas estimulan la síntesis de OC8-HSL, amplificando su efecto e incrementando la gravedad de los síntomas en la planta. *A. tumefaciens* produce también dos lactonasa de AHLs: AttM y AiiB (Zhang et al. 2002, Carlier et al. 2003). La expresión de las dos lactonasa está a su vez regulada por sustancias que produce la planta como respuesta a la infección, como el ácido γ -aminobutírico o GABA y el ácido salicílico, que modulan las funciones reguladas por QS de la bacteria a través del control de los niveles de la AHL que sintetiza, reduciendo la gravedad de los síntomas (Haudecoeur y Faure 2010). De manera que el QS junto con las enzimas de QQ de *A. tumefaciens* podrían funcionar como señalización entre distintos reinos entre la planta y la bacteria (Haudecoeur y Faure 2010).

4.2. QQ en *Acinetobacter* spp.

El género *Acinetobacter* es bien conocido por su versatilidad metabólica que le permite adaptarse a diferentes nichos ecológicos según el origen de la especie (Vallenet et al. 2008). Un ejemplo son las rutas de degradación de varios ácidos dicarboxílicos de cadena larga y compuestos aromáticos e hidroxilados que presentan varias especies de *Acinetobacter*, asociados con plantas de tratamiento de aguas residuales (Yoshida et al.

1975, Jung et al. 2010, Kang y Park 2010b). La mayoría de las especies del género son eficientes degradadoras de aceites (Walzer et al. 2006). *Acinetobacter* también es capaz de crecer utilizando AHLs del medio como fuente de carbono y nitrógeno (Chan et al. 2011). En varios ecosistemas se ha observado la existencia de bacterias productoras y degradadoras de AHLs que representa una estrategia para la adquisición de ventajas competitivas entre los microorganismos (Morohoshi et al. 2009). Es el ejemplo del ecosistema del estómago de langostino, en el intestino del pez japonés Ayu (*Plecoglossus altivelis*) o en la superficie de plantas (Morohoshi et al. 2005, 2009, Ochiai et al. 2013). En plantas de tratamiento de aguas residuales también existen numerosas bacterias productoras y degradadoras de AHLs, en las cuales el QS está implicado en la formación de una capa de *biofouling*-la base del crecimiento de otros organismos superiores- en la superficie de membrana de los biorreactores (Yeon et al. 2009). Un estudio acerca de estas plantas de tratamiento de aguas residuales reveló que *Acinetobacter* es el género dominante entre las bacterias que se encuentran en los lodos activados en los cuales ocurren los procesos de biorremediación (Ochiai et al. 2013).

Las bacterias que poseen mayor impacto en las propiedades de los ecosistemas polimicrobianos son las que producen señales de QS a la vez que modulan o degradan las señales producidas por otras bacterias (Chan et al. 2011). Varios aislados ambientales del género *Acinetobacter* presentan actividad QQ siendo capaces de degradar distintas AHLs, presumiblemente mediante actividad de QQ enzimática (Ochiai et al. 2013). *Acinetobacter* sp. C1010 es capaz de degradar AHLs (C6-HSL, hexanoíl homoserín lactona y OHSL, octadecanoyl homoserín lactona), producidas por *Pseudomonas chlororaphis* O6 y *Burkholderia glumae*, mediante la acción de una enzima que aún está sin identificar (Kang et al. 2004), indicando que determinadas cepas de *Acinetobacter* también podrían usarse como agentes de control efectivo contra bacterias patógenas de plantas (Kang et al. 2004). La coexistencia de QS y QQ también se demostró en *Acinetobacter* sp. GG2, una cepa asociada a la rizosfera de jengibre (*Zingiber officinale*), que degrada AHLs mediante actividad lactonasa a la vez que produce moléculas de QS (Chan et al. 2011).

Distintos autores describieron distintas enzimas con posible actividad QQ en este género, como la enzima intracelular del aislado de aguas residuales *Acinetobacter* sp. HMS-1, con un 99% de homología con *Acinetobacter johnsonii*, que degrada AHLs producidas por *Aeromonas* sp. (Kim et al. 2014). En el caso de las especies con relevancia clínica, algunos autores realizaron búsquedas de enzimas de QQ en varios genomas de *A. baumannii*, aunque es un proceso difícil debido a que la similitud entre las enzimas de QQ no es muy elevada. Además, las enzimas de QQ con actividad de tipo lactonasa comparten alrededor de un 25% de homología y el motivo conservado de las lactonasas pertenecientes a la superfamilia de las metalo- β -lactamasas (HXHXDH) es compartido por varias familias no relacionadas de proteínas (metalo- β -lactamasas, glioxilasas II y arilsulfatasas) (Vallenet et al. 2008). En una de estas búsquedas, se encontró una enzima candidata degradadora de AHLs de tipo lactonasa en los genomas de la cepa multirresistente a antibióticos *A. baumannii* AYE, de la cepa sensible a antibióticos *A. baumannii* SDF y de la especie ambiental *A. baylyi* (Vallenet et al. 2008). Esta enzima se corresponde por homología con una lactonasa putativa que aparece depositada en la base de datos del NCBI como YtnP en el genoma de la cepa multirresistente *A. baumannii* A155 (Arivett et al. 2015). En esta cepa también se anotó en el genoma otra lactonasa con actividad QQ putativa, la Y2-AiiA (Arivett et al. 2015), sin embargo, en *A. baumannii* A155 las secuencias de estas lactonasas putativas solo fueron anotadas al secuenciar su genoma sin comprobar la actividad QQ de las mismas (Arivett et al. 2015). Se ha descrito un homólogo de Y2-AiiA en la cepa ambiental

Acinetobacter oleivorans DR1, como una lactonasa putativa de AHLs que se sobre-expresa en el mutante de la sintasa *aqsI*, correlacionando el QQ con el sistema de QS (Kang y Park 2010a).

Mientras se realizaba este trabajo, en varios aislados de *A. baumannii* también se ha encontrado una enzima de QQ perteneciente a la familia de las α/β hidrolasas, AidA, tras añadir al cultivo la señal OC12-HSL (López et al. 2017). AidA presentó actividad QQ contra OC12-HSL subclonada en *E. coli* (López et al. 2017). Los aislados clínicos de *A. baumannii* donde se encontró AidA, no presentaron motilidad asociada a superficie en medio LB con baja concentración de sal y nutrientes (LBM), salvo en el único aislado que presentó motilidad en las mismas condiciones y ausencia de actividad QQ, asociando la presencia de la enzima AidA con la ausencia de motilidad en este medio (López et al. 2017). Sin embargo, buscando genes homólogos a AidA en *A. nosocomialis* M2 observamos que no presenta un gen idéntico a *aidA* en su genoma aunque existe una α/β hidrolasa con un 35% de homología. Además de AidA, solo se ha demostrado la actividad QQ de dos enzimas identificadas en el género *Acinetobacter*. Una de ellas es AmiE, con actividad QQ de tipo acilasa en *Acinetobacter* sp. Ooi24, una cepa aislada del lodo activado de una planta de tratamiento de aguas residuales que pertenece a la familia amidasa y presenta actividad QQ contra AHLs de cadena larga (Ochiai et al. 2014). La otra enzima con actividad QQ demostrada es AidE, con actividad de tipo lactonasa en *Acinetobacter* sp. 77 (Liu et al. 2017). Se han encontrado homólogos de AmiE en los genomas de otras dos especies de *Acinetobacter* filogenéticamente diferentes de la cepa Ooi24: *Acinetobacter ursungii* CIP107286 y *Acinetobacter* sp. CIP102129 (Ochiai et al. 2014). Sin embargo, no se encontró ningún homólogo en los genomas de *Acinetobacter* depositados en las bases de datos, indicando que no es una enzima conservada en el género y sugiriendo que *amiE* es transferida por un transposón que contiene la acilasa (Ochiai et al. 2014).

Parece ser que el QS también está relacionado con la degradación de hidrocarburos en especies de *Acinetobacter*. La lactonasa de AHLs descrita por Kang y Park (2010a), se encuentra sobre-expresada en el mutante de la sintasa de AHLs *aqsI*, de *A. oleivorans* DR1 y en la variante de la cepa resistente a rifampicina DR1R que produce sólo 1 señal de QS en comparación con la cepa parental DR1 que origina 3 señales de QS. La menor producción de señales de QS podría estar asociada a la sobre-expresión de la enzima de QQ descrita en esta cepa, correlacionando los sistemas de QS y QQ con la adquisición de resistencia a antibióticos (Kang y Park 2010a). Además, en *Acinetobacter* la actividad de QS y QQ debe estar muy relacionada, ya que el mutante del receptor de AHLs *aqsR* de *A. oleivorans* DR1 presentó una menor capacidad de degradación de hexadecanos que la cepa salvaje (Kim y Park 2013), en la cual el sistema de QS tiene un papel importante en la biodegradación de estos compuestos (Kang y Park 2010ab).

Adicionalmente, se ha observado que en el estado de latencia que sufre el aislado clínico de *A. baumannii* AbH12O-A2 bajo condiciones de disecación y/o inanición, se sobre-expresan proteínas de la familia de las metalo- β -lactamasas potencialmente relacionadas con el QQ, aparte de bombas de expulsión de antibióticos y proteínas de membrana y periplasmáticas (Gayoso et al. 2014). Un ejemplo es el de una enzima hidrolasa dependiente de zinc, perteneciente a la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, que se sobre-expresa en células en estado latente del aislado clínico de *A. baumannii* AbH12O-A2 (Gayoso et al. 2014). Además se corresponde con la YtnP de *A. baumannii* A155 (comparten un 99% de homología), presente además en otros 3 genomas de *Acinetobacter*. Otro ejemplo es el de una enzima hidrolasa dienelectona que, como la anterior, también se sobre-expresa en *A. baumannii* AbH12O-A2 en condiciones de estrés por disecación (Gayoso et al. 2014). En *Rhizobium* sp. NGR234 la

enzima hidrolasa diene lactona (DhlR) que presenta actividad lactonasa, inhibe la formación de biopelícula y otros procesos dependientes de QS en *P. aeruginosa*, *C. violaceum* y *A. tumefaciens* (Krysciak et al. 2011). Sin embargo, la bibliografía refleja que en ninguno de estos casos, ha sido comprobada la actividad contra AHLs de estas enzimas.

4.3. QQ contra la virulencia de *A. baumannii*

Debido a la relevancia del QS en la patogénesis de *Acinetobacter*, el sistema de inhibición de QS presenta un gran potencial para tratamientos antipatogénicos basados en estas estrategias (Erdönmez et al. 2017). La identificación de las moléculas señal producidas por *Acinetobacter* podrían constituir un punto de partida para el desarrollo de nuevos antimicrobianos (Erdönmez et al. 2017). En las últimas décadas se han realizado numerosos esfuerzos para poder aplicar las enzimas de QQ en la atenuación de la virulencia bacteriana en patógenos. En *Acinetobacter*, varios estudios han descrito la posibilidad de utilizar enzimas de QQ contra la biopelícula que produce. Un ejemplo es la lactonasa termoestable de QQ GKL identificada en *Geobacillus kaustophilus* y catalíticamente mejorada, que inhibió la biopelícula en los aislados clínicos *A. baumannii* S1, S2 y R2 (Chow et al. 2010, 2014). MomL, una lactonasa de QQ identificada en *Muricauda olearia*, redujo la biopelícula de *A. baumannii* LMG1031 (Zhang et al. 2017). Sin embargo, en *A. calcoaceticus* LMG10517, *A. nosocomialis* M2 y *A. baumannii* AB5075 no fue capaz de evitar la formación de biopelícula (Zhang et al. 2017).

Otra estrategia válida para inhibir el sistema de QS es el uso de agonistas o antagonistas de las señales AHLs, pudiendo prevenir la formación de biopelícula y motilidad en *A. nosocomialis* M2 (Stacy et al. 2012, 2013). Compuestos naturales como el linalool del cilantro (*Coriandrum sativum*), también inhiben la formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 mediante la interferencia con el sistema de QS (Alves et al. 2016), al igual que la actividad QQ del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) reduce la producción de biopelícula de *A. baumannii* al mismo tiempo que disminuye la expresión de la sintasa de AHLs *abaI* (Bhargava et al. 2015). El extracto de ajo (*Allium sativum*) así como la adición de otros inhibidores de QS sintéticos (4-nitro-óxido de piridina o 4-NPO) inhiben el crecimiento celular y la formación de biopelícula en *A. junii* BB1A en presencia de iones metálicos o metaloides (Sarkar y Chakraborty 2007).

Por último, hay que citar la pequeña molécula virstatina que algunos autores defienden que inhibe la expresión del receptor de AHLs *anoR* *A. nosocomialis* ATCC17903^T afectando a la motilidad y formación de biopelícula (Oh y Choi 2015). Además, presenta actividad anti-biopelícula contra *A. baumannii* ATCC17978 reduciendo casi un 40% en ATCC17978 y alrededor de un 65% de la producción de biopelícula en varios aislados clínicos (Nait Chabane et al. 2014b). Algunos antibióticos también inhiben el sistema de QS: concentraciones subinhibitorias de estreptomina inhiben el QS reduciendo los niveles de expresión de *abaI* y del gen A1S_0112 del operón de QS en *A. baumannii*, sin embargo, también puede actuar como un antagonista de AbaR para prevenir la activación positiva de la sintasa de AHLs *abaI* mediante el complejo AHL-AbaR (Saroj y Rather 2013).

A pesar de la relevancia clínica de *A. baumannii*, no se conoce demasiado acerca de sus sistemas de QS y QQ ni de su relación entre ellos, ya que la mayor parte de los trabajos realizados en especies de relevancia se realizaron con *A. nosocomialis* M2. Aunque está demostrado que el QS está involucrado de forma importante en la motilidad y formación de biopelícula del género *Acinetobacter*, como se explica a lo largo de toda esta introducción, hasta el momento, poco se sabe sobre la correlación

entre el QS mediado por AHLs y estos importantes factores de virulencia, ni se conoce demasiado sobre los sistemas reguladores o estímulos medioambientales que puedan controlan su expresión, ni el papel del QQ en el control de los circuitos de producción de señales en esta especie. Por todo esto, el objetivo principal de este trabajo fue el estudio de las señales de QS en la cepa tomada como referencia de la especie, *A. baumannii* ATCC17978, cuyo genoma está totalmente secuenciado y disponible, así como la caracterización del sistema propio de QQ. Además, se investigó la relación entre estos sistemas de comunicación bacteriana dependientes de la densidad celular, con la motilidad y la formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978 y la posible aplicación de inhibidores de QS para determinar su posible aplicación en el biocontrol del género *Acinetobacter*.





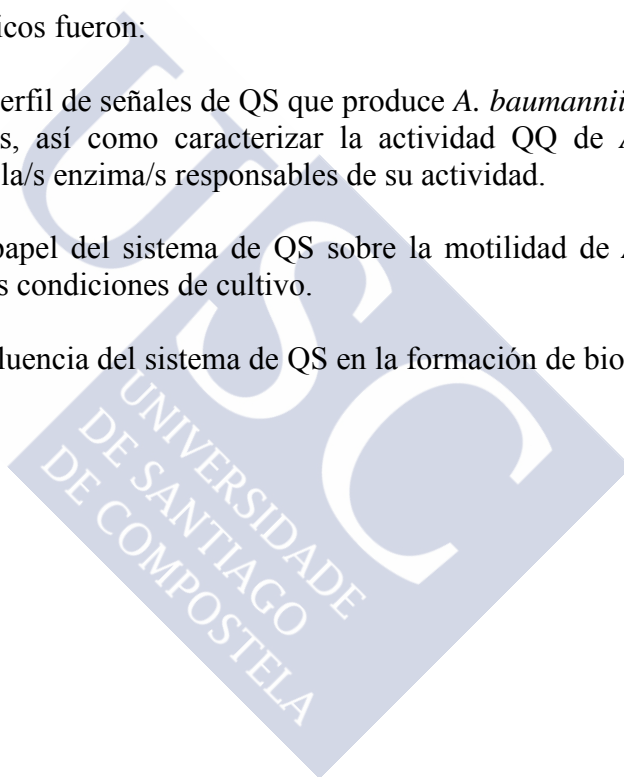
OBJETIVOS



El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar el sistema de QS de *A. baumannii* ATCC17978 y analizar su influencia sobre la motilidad y la formación de biopelícula.

Los objetivos específicos fueron:

1. Identificar el perfil de señales de QS que produce *A. baumannii* ATCC17978 bajo distintas condiciones, así como caracterizar la actividad QQ de *A. baumannii* ATCC17978 e identificar la/s enzima/s responsables de su actividad.
2. Examinar el papel del sistema de QS sobre la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 bajo distintas condiciones de cultivo.
3. Analizar la influencia del sistema de QS en la formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978.







MATERIALES Y MÉTODOS



1. Cepas bacterianas y plásmidos

Todas las especies, plásmidos y cebadores utilizados en este trabajo aparecen en la tabla 1. Para cultivar de manera rutinaria en el laboratorio a los aislados, cepas y especies del género *Acinetobacter* (Tabla 1), se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (1% NaCl, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura) a 37°C, suplementado con 25 µg/mL de kanamicina en el caso del mutante de la sintasa de AHLs $\Delta abal$ (*abaI::km*) de *A. nosocomialis* M2 (Niu et al. 2008). Las cepas *Escherichia coli* XL1blue y *E. coli* BL21(DE3)plysS usadas para la clonación y sobre-expresión de los genes de las lactonasas del género *Acinetobacter* se cultivaron a 37°C en medio TSA-1 con y sin tetraciclina (25 µg/mL), respectivamente. Las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pET28c(+) se cultivaron en medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 25 µg/m y a 37°C. Además, se utilizaron *Chromobacterium violaceum* CV026 o VIR07 como cepas biosensoras para la detección de AHLs (McClellan et al. 1997, Morohoshi et al. 2008a). Estos biosensores se cultivaron de forma rutinaria en medio LB suplementado con kanamicina (25 µg/mL) a 30°C. El biosensor de AHLs *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, se mantuvo en el laboratorio en medio LB suplementado con gentamicina (30 µL/mL) (Torres et al. 2013). La triptona y el extracto de levadura utilizados en este trabajo fueron suministrados por BactoDifco.

2. Extracción de AHLs

Para obtener el perfil de las señales de QS, las cepas, especies o aislados de *Acinetobacter* se cultivaron en matraces de 250 mL con 100 mL de medio LB, LB modificado con bajo porcentaje de nutrientes y sal (LBM) (0,5% NaCl, 0,2% triptona y 0,1% de extracto de levadura), LB con baja concentración de sal (<NaCl) (0,5% NaCl, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura), medio mínimo o MMA (González et al. 2001), LB con virstatina (Sigma) a 100 µM o LB tamponado con el tampón PIPES o ácido piperazina-*N,N'*-bis(2-etanosulfónico) (Sigma) a 200 mM, pH 6,0, para prevenir la posible lactonólisis espontánea de las señales (Yates et al. 2002). El medio MMA contiene: 1% de ácido láctico, 37mM NH₄Cl, 0,81 mM MgSO₄, 18 µM FeSO₄ · 7 H₂O, 68 µM CaCl₂, 11 mM KH₂PO₄, 95 mM Na₂HPO₄ y 1 ml (por L) de una solución con 50 g EDTA, 2,2 g ZnSO₄ · H₂O, 1,6 g CuSO₄ · 5H₂O, 5 g Cl₂ · 4H₂O, 1,1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 50 mg H₃BO₃, 10 mg KI y 50 mg CoCl₂ · 6H₂O.

Los cultivos se mantuvieron en estático o en agitación (170 rpm) a 37°C. A distintos tiempos de la curva de crecimiento (0, 6, 12, 17, 24, 36 y 48 h) y a 17 h para LB con baja sal, LB con virstatina y medio MMA, se centrifugó la biomasa y los sobrenadantes, con o sin acidificación (24 h, a pH 2,0, 170 rpm a 22°C), se extrajeron dos veces con el mismo volumen de diclorometano. El solvente se evaporó en un rotavapor a 40°C y las extracciones se resuspendieron en 1 mL de acetonitrilo. El medio de cultivo y el solvente se extrajeron de la misma forma para utilizarlos como controles negativos.

Tabla 1. Distintas especies/aislados, plásmidos y cebadores, utilizados en este trabajo. Las enzimas de restricción utilizadas en los cebadores aparecen subrayadas e indicadas en su secuencia.

Cepa o plásmido	Descripción	Fuente o referencia
Cepas		
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC17978		ATCC ^a
<i>abaI</i> (ATCC17978)	Mutante <i>knock out</i> (KO) estable sin el gen de la sintasa de AHLs <i>abaI</i> (A1S_0109)	INIBIC ^b
<i>adeB</i> (ATCC17978)	Mutante <i>knock out</i> (KO) estable sin el gen <i>adeB</i> (A1S_1750) de la bomba de eflujo de antibióticos AdeABC	INIBIC ^b
Ab1 (ROC013)	Aislado clínico de <i>A. baumannii</i> procedente de una muestra del aparato respiratorio. Tipado molecular (TM): ST2	INIBIC ^b
Ab2 (COR005)	Aislado clínico de <i>A. baumannii</i> procedente de una muestra de úlcera. TM: ST186	INIBIC ^b
Ab3 (PON002)	Aislado clínico de <i>A. baumannii</i> procedente de una muestra del aparato respiratorio. TM: ST52	INIBIC ^b
Ab4 (VAL001)	Aislado clínico de <i>A. baumannii</i> procedente de una muestra del aparato respiratorio. TM: ST169	INIBIC ^b
Ab5 (DOM009)	Aislado clínico de <i>A. baumannii</i> procedente de una muestra del aparato respiratorio. TM: ST80	INIBIC ^b
Ab6 (HMV001)	Aislado clínico de <i>A. baumannii</i> procedente de una muestra de exudado. TM: ST181	INIBIC ^b
Ab7 (HUI001)	Aislado clínico de <i>A. baumannii</i> procedente de una muestra de sangre. TM: ST79	INIBIC ^b
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		
AC	Aislado de <i>A. calcoaceticus</i> de origen de aislamiento desconocido. TM: ST88	INIBIC ^b
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		
M2		Niu et al. 2008
<i>Abal</i> (M2)	Mutante de la sintasa <i>abaI</i> (<i>abaI::Km</i>), Km ^r	Niu et al. 2008
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
NTL4	(pZLR4), biosensor de AHLs, Gm ^r	Torres et al. 2013
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
CV026	Biosensor de AHLs, Km ^r	McClellan et al. 1997
VIR07	Biosensor de AHLs, Km ^r	Morohoshi et al. 2008a
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)plysS	Cepa de sobre-expresión de proteína	Promega
XL1blue	Cepa de clonación y multiplicación de ADN, Tc ^r	Agilent
Plásmidos		
pET28c(+)	Vector de clonación, Km ^r	Novagen
pET28c(+)-<i>aii20J</i>	Vector de clonación con el ORF del gen <i>aii20J</i> de <i>Tenacibaculum</i> sp. 20J, Km ^r	Mayer et al. 2015
pET28c(+)-A1S_0383	Vector de clonación con el ORF del gen A1S_0383 de <i>A. baumannii</i> ATCC17978, Km ^r	Este trabajo
pET28c(+)-A1S_1876	Vector de clonación con el ORF del gen A1S_1876 de <i>A. baumannii</i> ATCC17978, Km ^r	Este trabajo
pET28c(+)-A1S_2662	Vector de clonación con el ORF del gen A1S_2662 de <i>A. baumannii</i> ATCC17978, Km ^r	Este trabajo

^a American Type Culture Collection

^b Instituto de Investigación Biomédica (A Coruña)

Tabla 1 (Continuación). Distintas especies/aislados, plásmidos y cebadores, utilizados en este trabajo. Las enzimas de restricción utilizadas en los cebadores aparecen subrayadas e indicadas en su secuencia.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Uso en este estudio
<i>abaI_Fwd</i>	TGTGCCAGACTACTACCCAC	qRT-PCR
<i>abaI_Rev</i>	TGCTAGAGGAAGCGGATTT	qRT-PCR
<i>abaR_Fwd</i>	TTGGTTCGAGTCAATCTGCAA	qRT-PCR (Eijkelkamp et al. 2013)
<i>abaR_Rev</i>	CTCGGGTCCCAATAAAATCA	qRT-PCR (Eijkelkamp et al. 2013)
<i>adeB_Fwd</i>	GCTACCTTCAGATGCAACCG	qRT-PCR
<i>adeB_Rev</i>	TAGATGCAGAGCTAGTCCGC	qRT-PCR
<i>blsA_Fwd</i>	TGCCAGCCAACGAAATGAAA	qRT-PCR
<i>blsA_Rev</i>	ACGACCTCTTGTTCACCTTCT	qRT-PCR
<i>bfmS_Fwd</i>	TGACGACCCACAACATTACTTAT	qRT-PCR
<i>bfmS_Rev</i>	ATGACACTTTGGTCTTGGCG	qRT-PCR
<i>csuD_Fwd</i>	AGTCACAACATCGGTCCCAT	qRT-PCR
<i>csuD_Rev</i>	AAGTTCGGTGCCTCTTCTA	qRT-PCR
<i>gacS_Fwd</i>	GCGACCAAGCCATTTTCATCT	qRT-PCR
<i>gacS_Rev</i>	GGCAGAGGACTTGCGAATAG	qRT-PCR
<i>hns_Fwd</i>	GCTTCTAGAATTTGGCGCTCA	qRT-PCR
<i>hns_Rev</i>	AGAAATCTTCAAGTTTTGCACCT	qRT-PCR
<i>rpoB_Fwd</i>	GTGCTGACTGACGCGTGAT	qRT-PCR (Park y Ko 2015)
<i>rpoB_Rev</i>	AGCGTTCAGAAGAGAAGAAACAAGTT	qRT-PCR (Park y Ko 2015)
<i>pilT_Fwd</i>	GCTACTCGCCTTCTCTGTGA	qRT-PCR
<i>pilT_Rev</i>	GTCACGGCGCTGTTATCAT	qRT-PCR
<i>A1S_0383_Fwd</i>	ACCAGGTCACGTCATGTTCT	qRT-PCR
<i>A1S_0383_Rev</i>	TGGTACTCATTGGCCCATGT	qRT-PCR
<i>A1S_1708_Fwd</i>	ATTGAAGCGCGTTACACACC	qRT-PCR
<i>A1S_1708_Rev</i>	ATAGTGTGTCAGGCAGGCT	qRT-PCR
<i>A1S_1876_Fwd</i>	GCAGTCATATGGTCCGCATG	qRT-PCR
<i>A1S_1876_Rev</i>	TTAGCAACCCGTCAATGTGC	qRT-PCR
<i>A1S_2194_Fwd</i>	TCCCTGGCATTACTCATCCC	qRT-PCR
<i>A1S_2194_Rev</i>	TTCAAATAGTCGCCCGCATC	qRT-PCR
<i>A1S_2662_Fwd</i>	TCTGCTTCACGTTTCATGAGC	qRT-PCR
<i>A1S_2662_Rev</i>	CTGCGAGTTGTTTTGGTCCA	qRT-PCR
<i>A1S_2864_Fwd</i>	GCCACTGAATACAATGCTGC	qRT-PCR
<i>A1S_2864_Rev</i>	TCGCAATACCACAATGTCCG	qRT-PCR
<i>aidA_Fwd</i>	TCGCTGCACGTTTGTACTC	qRT-PCR
<i>aidA_Rev</i>	CCATCGGCGTAGTGCTTAAT	qRT-PCR
<i>0383Fwd</i>	GATTAACCATGGTACTGCAAGTCAAAAATTGTTCCAG (NcoI)	Clonación lactonasas
<i>0383Rev</i>	GCTATGAATTCAAAACCCGCTTACCTGCGACAAACG (EcoRI)	Clonación lactonasas
<i>1708Fwd</i>	GATTAACCATGGTATTCTTTAAGCAGTTTTTTG (NcoI)	Clonación lactonasas
<i>1708Rev</i>	GCTATGAATTCAAATAATTGTGAAAATTGAGCCGCAAGC (EcoRI)	Clonación lactonasas
<i>1876Fwd</i>	GATTAACCATGGTACAACAACCTCTAGTAAAAGA(NcoI)	Clonación lactonasas
<i>1876Rev</i>	GCTATGAATTCAAAAAGTAATTAATGGGATT (EcoRI)	Clonación lactonasas
<i>2194Fwd</i>	GATTAACCATGGTACGTTATAGAAATTCATTATAT (NcoI)	Clonación lactonasas
<i>2194Rev</i>	GCTATGGATCCAAAAAATTGTCTTTAAGCTACG (BamHI)	Clonación lactonasas
<i>2662Fwd</i>	GATTAACCATGGTAAAAAACTATTTGTAGCCTTAGG (NcoI)	Clonación lactonasas
<i>2662Rev</i>	GCTATGAATTCATTTATCAAGACTGTTATTA (EcoRI)	Clonación lactonasas
<i>2864Fwd</i>	GATTAACCATGGTAAGCCACCTCGACTTTGA	Clonación lactonasas
<i>2864Rev</i>	GCTATGAATTCAGTTTGGTACCGCCGAAGCTC	Clonación lactonasas
<i>aidAFwd</i>	GATTAACCATGGTA.GGTAAGTCTAAATAATGT	Clonación lactonasas
<i>aidARev</i>	GCTATGAATTCAACTTGACTGGAACGATGCGTTTA	Clonación lactonasas
<i>T7Fwd</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGAA	Cebadores universales
<i>T7Rev</i>	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Cebadores universales
<i>luxI PF</i>	GGTTGGGAGTTGAACTGTCC	Amplificación <i>abaI</i> (Bitrian et al. 2012)
<i>luxI PR</i>	GGTTGGGAGTTGAACTGTCC	Amplificación <i>abaI</i> (Bitrian et al. 2012)
<i>luxR PF</i>	TCGGATTGATTATTGCGCTTATG	Amplificación <i>abaR</i> (Bitrian et al. 2012)
<i>luxR PR</i>	ACAGCTCGAATAGCTGCTG	Amplificación <i>abaR</i> (Bitrian et al. 2012)

3. Detección de AHLs

3.1. Detección de AHLs mediante biosensores

Para detectar si las cepas, aislados o especies de *Acinetobacter* producían señales de QS se realizó un bioensayo de detección directa en placa o de difusión, con los biosensores de AHLs *Chromobacterium violaceum* CV026 y VIR07 (McClellan et al. 1997, Morohoshi et al. 2008a). Estos biosensores son incapaces de producir el pigmento violaceína sin la adición de AHLs exógenamente, por lo que si la especie o aislado produce AHLs los biosensores producirán el pigmento violaceína (Remuzgo-Martínez et al. 2015). Para ello, las cepas, especies o aislados de *Acinetobacter* se inocularon sobre la superficie de una placa de LB, o LB con baja concentración de sal (0,5%), sembrando con la ayuda de un hisopo una línea uniforme. Los biosensores se sembraron de forma paralela a cada lado de la especie o aislado a analizar. Las placas se incubaron durante 24 h a 30°C.

Para detectar la cantidad mínima de OHC12-HSL (*N*-hidroxidodecanoil-L-homoserín lactona), que detecta el biosensor *C. violaceum* VIR07, se realizó un bioensayo de detección de QS en pocillo. Para ello se prepararon placas de LB recubiertas con 5 mL de una dilución 1/100 de un cultivo de 24 horas del biosensor en LB semi-sólido (0,8% de agar), en las cuales se practicaron distintos pocillos. A continuación se añadieron a los pocillos 100 µL de distintas soluciones en tampón fosfato salino o PBS 6,7 pH de la AHL a una concentración final de 1, 10 y 100 µM. Las placas se incubaron a 30°C, durante 24 h, para observar la producción de un halo del pigmento violaceína alrededor del pocillo.

La presencia de AHLs también se detectó mediante bioensayo en pocillo con el biosensor de AHLs *A. tumefaciens* NTL4 (modificado de Torres et al. 2013). Para ello, se prepararon placas de medio AB (*Agrobacterium* medium) (Torres et al. 2013), con gentamicina (50 µg/mL), cubiertas con 5 mL de una dilución 1/5 de un cultivo de 17 h del biosensor en LB semi-sólido (0,8% de agar) suplementado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido o X-gal (80-160 µg/mL). Una vez solidificadas las placas, se realizaron pocillos en las mismas y se añadieron 100 µL de las extracciones de sobrenadantes de los cultivos de *Acinetobacter* preparadas anteriormente y secadas mediante nitrógeno en baño a 50°C y resuspendidas en PBS pH 6,7. Como control positivo se usó el PBS 6,7 pH con la misma concentración de AHL añadida. Las placas se incubaron a 30°C, durante 24 h, para observar la producción de un halo de coloración azul alrededor de la superficie del pocillo como indicador de presencia de AHLs.

Para detectar AHLs también se realizaron cromatografías en capa fina (0,25 mm sílica gel, Sigma) con las extracciones de los sobrenadantes de *Acinetobacter*. Para ello, estas extracciones se evaporaron bajo flujo de nitrógeno en baño a 50°C y los extractos secos se resuspendieron en el solvente etilo acetato. 1 o 100 µL de cada resuspensión se inocularon en placas de cromatografía en capa fina de gel de sílice (Sigma) previamente activadas mediante calor en horno durante media hora a 120°C y posterior desarrollo con una mezcla de metanol 45% - agua 55%. La placa se secó en cámara de flujo y sobre una placa de LB suplementado con gentamicina (50 µg/mL), se cubrió con una capa de LB semi-sólido (0,8%) con 1 mL de un cultivo de 17 h de *A. tumefaciens* NTL4. El solvente etiloacetato y la señal de QS, disuelta en el mismo solvente a 0,1 mg/mL, se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente. El resultado de la cromatografía se reveló cubriéndola con 5 mL de una dilución 1/5 de un cultivo de 17 h del biosensor *A. tumefaciens* NTL4 en LB semi-sólido (0,8% de agar) suplementado con 160 µg/mL de X-gal en placas de medio AB con gentamicina (50 µg/mL). Tras incubar las placas a 30°C durante 24 h, se observó la producción de coloración azul como indicador de presencia de AHLs.

3.2. Identificación del perfil de AHLs mediante HPLC-MS

Mediante HPLC-MS se identificaron y cuantificaron las señales de las extracciones de los sobrenadantes de las cepas, especies o aislados de *Acinetobacter*. El análisis se llevó a cabo con un HPLC 1100 series (Agilent Technologies) y las señales sintéticas *N*-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL), *N*-3-oxohexanoil-L-homoserín lactona (OC6-HSL), *N*-octanoil-L-homoserín lactona (C8-HSL), *N*-3-oxooctanoil-L-homoserín lactona (OC8-HSL), *N*-hidroxioctanoil-L-homoserín lactona (OHC8-HSL), *N*-3-oxodecanoil-L-homoserín lactona (OC10-HSL), *N*-hidroxidecanoil-L-homoserín lactona (OHC10-HSL), *N*-3-oxododecanoil-L-homoserín lactona (OC12-HSL), *N*-hidroxidodecanoil-L-homoserín lactona (OHC12-HSL), *N*-3-oxotridecanoil-L-homoserín lactona (OC13-HSL), *N*-3-oxotetradecanoil-L-homoserín lactona (OC14-HSL), *N*-hidroxitetradecanoil-L-homoserín lactona (OHC14-HSL) y *N*-hexadecanoil-L-homoserín lactona (C16-HSL) fueron usadas como referencia para su identificación (Romero et al. 2014). Todas las AHLs utilizadas en este trabajo fueron adquiridas en Sigma, salvo la OC13 y C16-HSL que se sintetizaron en la University of Nottingham.

El análisis se llevó a cabo con un HPLC 1100 series (Agilent EEUU) equipado con una precolumna C8 (2,1 x 12,5 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. La fase móvil consistió en 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B) con una tasa de flujo 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 del 60 al 95% de B durante 5 min, 95% de B durante 5 min y un minuto para volver a las condiciones iniciales que se mantuvieron durante 9 min. Se diluyeron alícuotas de 20 µL de cada muestra en acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico antes de su inyección en la columna. El espectrómetro de masas (MS) usado 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 fueron usadas 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).

4. Detección de actividad QQ

Para detectar si las especies y aislados del género *Acinetobacter* (Tabla 1), presentaban actividad degradadora de AHLs se realizaron bioensayos de inhibición de producción de violaceína en medio sólido, usando los biosensores de AHLs *C. violaceum* CV026 y VIR07, para las AHLs cortas y largas, respectivamente (McClean et al. 1997, Morohoshi et al. 2008a). Los bioensayos de actividad se realizaron tanto con células vivas de cultivos de las distintas especies y aislados de *Acinetobacter*, como con sus extractos celulares y los sobrenadantes de los cultivos.

Para los ensayos de actividad QQ en célula viva, las cepas, aislados o especies de *Acinetobacter* se cultivaron en LB durante 24 horas para en agitación para asegurarse de que estaban en fase estacionaria de la curva de crecimiento. De la misma forma, para obtener células vivas de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con las lactonasas de *A. baumannii* ATCC17978, *E. coli* con cada lactonasa se cultivó en LB con kanamicina (25 µg/mL) y se indujo o no la expresión de las lactonasas con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido o IPTG (Sigma) a una concentración de 1 mM, al alcanzar una densidad óptica (600 nm) de cultivo de entre 0,6 y 1, durante otras 5 h a 16°C. La biomasa de cada cultivo se recogió mediante centrifugación a 9000 rpm durante 10 min

y se resuspendió en el mismo volumen de PBS (pH 6,7). A continuación, se cogieron alícuotas de 500 μ L de cada suspensión en PBS y se incubaron con C6 y C12-HSL (*N*-dodecanoil-L-homoserín lactona, Sigma) a una concentración final de 10 μ M. Tras 24 h de exposición con la señal, las mezclas de reacción se centrifugaron 5 min a 10000 rpm y 100 μ L de los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para analizar la actividad QQ en bioensayo en medio sólido con biosensor.

Para determinar la actividad QQ se prepararon varios extractos celulares de los distintos aislados y especies del género en las mismas condiciones que para la identificación del perfil de señales de QS. Para su obtención, *Acinetobacter* spp. se cultivaron en LB, LB con baja sal (0,5%) o LB tamponado con tampón PIPES (200 mM, pH 6,0) con o sin agitación a 170 rpm, a 37°C. La biomasa de los cultivos recogidos a diferentes puntos de la curva de crecimiento se centrifugó a 9000 rpm, durante 10 min, para obtener el pellet. Además, la densidad óptica (600 nm) en LB y LB con baja sal se ajustó a 1 antes de realizar los extractos realizados para poder comparar la actividad QQ de los mismos. Los sobrenadantes de todos los extractos resultado de esta centrifugación se filtraron por 0,2 μ m y se reservaron para analizar también su actividad QQ. Para la realización de los extractos celulares el pellet recogido se lavó con PBS pH 6,7 para eliminar los posibles restos del medio y se resuspendió en el mismo volumen del mismo tampón. A continuación, se rompieron las células del pellet mediante sonicación con el aparato Branson Sonifier 250, con pulsos constantes de 30-40% a potencia media, durante 5 min y en hielo para no sobrecalentar las muestras. Por último, se centrifugaron de nuevo (9000 rpm, 10 min) y se filtraron por 0,2 μ m. Los extractos celulares más concentrados en LB tamponado con el tampón PIPES, se realizaron a partir de cultivos de 50 mL y se resuspendieron en un volumen final de 1,5 mL de PBS. Se incubaron alícuotas de 500 μ L de cada extracto o sobrenadante con una concentración final de 10 μ M de C6 y C12-HSL, durante 24 h a 22°C y 200 rpm. Tras la exposición con la señal se procedió al análisis de actividad QQ mediante biosensor.

Asimismo también se obtuvo el extracto celular de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)plysS en la cual se sobre-expresaron las lactonasas de *A. baumannii* ATCC17978. Se inocularon cultivos de 50 mL de LB suplementado con kanamicina (30 μ g/mL) con una colonia de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con el plásmido pET28c(+) con cada inserto correspondiente, incubándolos a 170 rpm, 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) del cultivo de entre 0,6-1 (0,6 la más recomendada). A estos cultivos se les añadió IPTG (1 mM) para inducir la sobre-expresión de las lactonasas y se dejó incubar durante 5 h a 16°C en las mismas condiciones. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 9000 rpm, se lavó el pellet con PBS 6,7 pH para eliminar los posibles restos del medio de cultivo y finalmente se resuspendió en 20 mL de PBS pH 6,7. El pellet resuspendido en PBS se sonicó en hielo con pulsos constantes de 30-40% a potencia media durante media hora. Por último, se centrifugaron otros 10 min a 9000 rpm y se filtraron por 0,2 μ m. La cantidad de proteína total de todos los extractos obtenidos en este trabajo se cuantificó mediante el método de Lowry (Lowry et al. 1951, modificado por Herbert et al. 1971). De los extractos celulares de las lactonasas en *E. coli* se hicieron diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 en tubos Eppendorf® con un volumen total de 250 μ L para la detección de actividad QQ. Cada dilución se incubó durante 24 h con las señales C6 y C12-HSL a una concentración final de 10 μ M, a 22°C, 200 rpm. Tras ese tiempo, se analizó mediante bioensayo en pocillo en medio sólido la actividad QQ mediante biosensor.

Para detectar actividad QQ de las lactonasas purificadas de *A. baumannii* ATCC17978 se ensayaron mediante la misma metodología.

Para detectar actividad QQ mediante bioensayo de inhibición de producción de violaceína en pocillo se utilizaron los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 (McClellan et al. 1997, Morohoshi et al. 2008a). Los ensayos de actividad ejecutados a lo largo de todo este trabajo fueron realizados en PBS ajustado a pH menor que 7 para controlar el pH del medio y asegurarnos de que las AHLs no se degradan por la apertura espontánea del anillo HSL de las señales debido a pH básicos (Yates et al. 2002). De cada extracto, sobrenadante o células vivas de los diferentes cultivos, se incubaron alícuotas de 250 o 500 μL con las distintas AHLs a una concentración final de 10 μM , a partir de una solución stock de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada señal. Tras 24 h de incubación con la señal a 22°C, 200 rpm, 100 μL de cada mezcla de reacción se añadieron a pocillos practicados en placas de LB con kanamicina cubiertas con 5 mL de una dilución 1/100 de un cultivo de 24 horas de las cepas biosensoras CV026 y VIR07 correspondientes en LB semi-sólido (0,8% de agar). Como control negativo se usó el PBS 6,7 pH con la misma concentración de cada AHL añadida. Las placas se incubaron a 30°C, durante 24 h, para observar la producción del pigmento violaceína. La actividad QQ se determinó por la ausencia de la producción del pigmento violaceína alrededor del pocillo.

4.1. Detección de actividad QQ mediante HPLC-MS

La confirmación de la actividad QQ de los extractos celulares de *A. baumannii* ATCC17978 se cuantificó mediante análisis con HPLC-MS. Para esto se prepararon extractos celulares de *A. baumannii* ATCC17978, tal y como se describió con anterioridad, a partir de cultivos de 50 mL de LB durante 17 o 24 h y en agitación a 170 rpm, resuspendidos en 20 mL de PBS. Se sonicaron durante media hora, se centrifugaron y se filtraron (0,2 μm). Se incubaron por triplicado alícuotas de 500 μL de los extractos con las señales C6, C12 y OCH12-HSL a una concentración de 10 μM durante 24 h a 22°C con agitación. Tras la exposición con la señal, se extrajeron 2 alícuotas de 200 μL de cada mezcla de reacción, con o sin acidificación durante 24 h (22°C, pH 2,0), para realizar una extracción orgánica de cada una, extrayendo tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo (200 μL). El solvente se recuperó y evaporó mediante flujo de nitrógeno en baño a 50°C y el extracto seco obtenido se resuspendió en 200 μL de acetonitrilo para su posterior análisis y cuantificación de la concentración de la señal restante por HPLC-MS. Como control se usó el PBS suplementado con la misma cantidad de AHL procesado y extraído del mismo modo. La lactonasa purificada Aii20J (Mayer et al. 2015) incubada con la misma cantidad de AHL y procesada del mismo modo, se usó como control positivo de actividad de tipo lactonasa a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El análisis de HPLC-MS se realizó en las mismas condiciones que Romero et al. (2014).

5. Ensayos de motilidad

5.1. Motilidad asociada a superficie

Los estudios de motilidad asociada a superficie de las especies, cepas y aislados de *Acinetobacter* se realizaron en placas Petri utilizando los medios de cultivo LB, LBM o LB con baja sal, solidificados con 0,2, 0,25 o 0,3% de agar Bacto™ Difco™ (Difco) o Eiken (Eiken Chemical Co. Ltd., Japón). Para investigar qué nutriente era el responsable del fenotipo de la motilidad asociada a superficie, la concentración de cada componente se redujo de manera independiente hasta alcanzar los mismos valores que en el LBM: NaCl (0,5%), triptona (0,2%), o extracto de levadura (0,1%) con 0,25% de agar Eiken. Las placas se prepararon el mismo día del ensayo y se dejaron secar en la cabina de flujo antes de usarlas. Las placas se inocularon con 1 μL de un cultivo de 17 h de *Acinetobacter* spp. a una densidad óptica (600 nm) de 0,3 y por triplicado. El efecto de

la osmolaridad sobre la motilidad asociada a superficie se evaluó preparando el medio de cultivo con distintas concentraciones de NaCl (0,1-0,4M) o sacarosa (0-20%) con agar Eiken (0,25%). En los estudios de regulación de la motilidad o la restauración del fenotipo de los mutantes de las sintasas, los cultivos ajustados a 0,3 (DO_{600nm}) se suplementaron según fue necesario con OHC12-HSL o con furanona C-30 (Sigma) a una concentración final de 10 µM, con la lactonasa de AHLs Aii20J (Mayer et al. 2015) a 20 µg/mL o con virstatina (Bachem) a 100 µM. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la motilidad asociada a superficie se observó tras 14 horas de incubación de las placas a 25, 30 o 37°C en oscuridad o bajo tres módulos LED que emiten luz azul con una intensidad de flujo de fotones de 5 a 6 µmol/m²/s.

5.2. Motilidad de tipo *twitching*

Para evaluar este tipo de motilidad, las placas se realizaron con medio LB o LB con baja concentración de sal suplementados con agar (Difco o Eiken) al 1% (o agarosa (Sigma) al 1% siguiendo el protocolo de Harding et al. (2013), dejando secar en la cámara solamente 20 minutos para favorecer la humectabilidad del medio. Los cultivos de *Acinetobacter* spp. de 17 h, o las colonias directamente, se inocularon mediante picadura en el fondo de la placa Petri de 96 mm o 150 mm de diámetro, por triplicado, con la ayuda de una punta de pipeta. Las placas se incubaron en una estufa de humedad a 37°C durante 14 horas. Para visualizar la bacteria en la interfase entre el medio y el fondo de la placa Petri, se eliminó el medio de cultivo semi-sólido con cuidado de cada placa.

6. Búsqueda de enzimas de QS y de QQ en *A. baumannii*

Para la amplificación de genes homólogos a *luxI/luxR* en *Acinetobacter* spp., primero se extrajo el ADN genómico de cada especie/aislado del género a partir de un cultivo de 24 h en LB y agitación (170 rpm) a 37°C con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante PCR se amplificaron las secuencias correspondientes utilizando los cebadores internos de las secuencias de los genes *luxI/luxR* (Tabla 1) con las condiciones indicadas en el apartado 7.2. Los fragmentos obtenidos con un tamaño esperado de alrededor de 370 pb y 600 pb para *abaI* y *abaR*, respectivamente, se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se secuenciaron en StabVida (Portugal). Las secuencias obtenidas se trataron de igual modo que en el apartado 7.3.

Mediante análisis bioinformático con las secuencias conocidas de enzimas de QQ descritas hasta el momento, se procedió a la búsqueda de nuevos enzimas de QQ en *A. baumannii* ATCC17978. Para ello, se utilizaron la herramienta *blast* del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la herramienta de búsqueda de dominios conservados *cd-search* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) del NCBI.

Para subclonar y sobre-expresar las enzimas de QQ de *A. baumannii* ATCC17978, en primer lugar se extrajo el genoma de *A. baumannii* ATCC17978 a partir de un cultivo de 24 h en LB y agitación (170 rpm) a 37°C con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante PCR se amplificaron las secuencias de ADN de los genes de cada lactonasa utilizando los cebadores 0383Fwd, 0383Rev, 1708Fwd, 1708Rev, 1876Fwd, 1876Rev, 2194Fwd, 2194Rev, 2662Fwd, 2662Rev, 2864Fwd y 2864Rev (Tabla 1). Los fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR se purificaron a partir de la electroforesis en un gel de agarosa al 1% mediante el Gel Extraction Kit (Omega) siguiendo el protocolo del fabricante y se enviaron a secuenciar a StabVida (Portugal).

7. Clonación de enzimas de QQ

7.1. Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados en las PCR para amplificar las secuencias de los genes de cada una de las lactonasas de *A. baumannii* ATCC17978, fueron diseñados específicamente a partir de las secuencias conocidas del plásmido utilizado más adelante y del inicio y final de la secuencia de cada gen depositada en el NCBI. Las secuencias de los pares de cebadores utilizados para amplificar las secuencias de las lactonasas se muestran en la tabla 1. En los cebadores se incluyeron las secuencias de los sitios de restricción para las enzimas NcoI y EcoRI o BamHI (Thermo Scientific) que permitieron subclonar los fragmentos obtenidos de los genes codificadores de las lactonasas para luego poder insertar en el plásmido pET28c(+) (Figura 4). Los pares de cebadores utilizados se construyeron teniendo en cuenta que las dianas de restricción no cortasen las secuencias de los genes de las lactonasas y manteniendo en pauta la secuencia del plásmido para que la cola de poli-histidina que el vector pET28c(+) permite añadir (Figura 4) se expresase correctamente.

Los cebadores universales T7Fwd y T7Rev (Tabla 1) se corresponden con la región del promotor y del terminador del plásmido pET28c(+) (Figura 4). Con ellos se amplificaron mediante PCR las secuencias para enviar a secuenciar y comprobar que el inserto en el vector estaba en la correcta pauta de lectura. Los cebadores *luxI* PF, *luxI* PR, *luxR* PF y *luxR* PR (Tabla 1) se usaron para buscar los genes correspondientes a la sintasa y el receptor de AHLs en *Acinetobacter* spp. (Bitrian et al. 2012). Los oligonucleótidos usados en este trabajo para la qRT-PCR se diseñaron utilizando el software del programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y aparecen anotados en la tabla 1.

Todos los cebadores diseñados en el laboratorio y utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma.

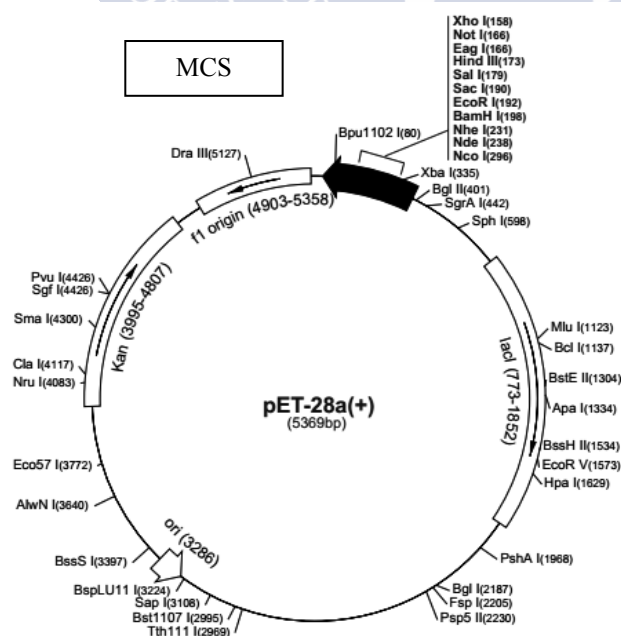


Figura 4. Plásmido pET28a(+). El plásmido pET28c(+) (5367 pb) utilizado para la clonación de las lactonasas tiene el mismo mapa que el de la figura a excepción de 2 pb que le faltan “aguas arriba” del sitio de restricción de *Bam*HI.

7.2. Condiciones de PCR

Todas las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) utilizando PCR beads de Healthcare, en las siguientes condiciones:

Para amplificar las secuencias de la sintasa y el receptor de AHLs de *Acinetobacter* spp. se utilizaron las condiciones de Bitrian et al. (2012), establecidas para los cebadores: 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 45 seg, hibridación a 58°C durante 45 seg, extensión a 72°C durante 1 min. Precedidos de 2 minutos de desnaturalización a 95°C y seguidos de 10 min de extensión a 72°C.

Para amplificar las secuencias de las enzimas de QQ A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2662, A1S_2864 y AidA de *A. baumannii* ATCC17978 las condiciones de PCR fueron: 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 45 seg, hibridación a 55°C durante 45 seg, extensión a 72°C durante 1 min. Precedidos de 5 minutos de desnaturalización a 95°C y seguidos de 10 min de extensión a 72°C. Con la lactonasa A1S_2194 no funcionaron estas condiciones de reacción por lo que se realizó de nuevo una PCR con gradiente de temperatura aumentando a 35 los ciclos de desnaturalización y la temperatura de hibridación a 45, 50 y 55°C. Sin embargo, no se consiguió amplificar la secuencia.

Las mismas condiciones de las lactonasas de QQ fueron utilizadas para amplificar posibles genes homólogos a estas enzimas en *A. nosocomialis* M2 y el resto de aislados clínicos disponibles, utilizando los mismos cebadores que para ATCC17978.

7.3. Secuenciación y análisis de secuencias

Todas las secuencias de este trabajo fueron enviadas a secuenciar a StabVida (Portugal) y las secuencias suministradas por StabVida fueron analizadas con los programas Editseq y SeqMan Pro de Lasergene y MEGA 5.1 Beta3 (Tamura et al. 2008) para ensamblar adecuadamente las secuencias. Para traducir las secuencias se utilizó la herramienta informática Protein translate de ExPASy eligiendo el marco abierto de lectura (ORF) adecuado. Para alinear las secuencias de las distintas lactonasas y de sus respectivas secuencias nucleotídicas se usaron las herramientas informáticas *blast* del NCBI al igual que para obtener las homologías entre las secuencias. Las secuencias aminoacídicas también se alinearon usando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y el programa MUSCLE (*Multiple sequence alignment*) del EMBL-EMI o *European Molecular Biology Laboratory-The european Bioinformatics Institute* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) para las secuencias de ADN y se sombrearon con el programa GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>) para observar la diferente homología de los residuos.

7.4. Clonación de las secuencias de interés

Para la clonación de los genes codificadores de las lactonasas A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2662, A1S_2864 y AidA de *A. baumannii* ATCC17978 se escogió el vector pET28c(+) (Figura 4).

Este vector fue elegido porque presenta la posibilidad de realizar un clonaje direccional y añade una proteína de fusión, en nuestro caso una cola de poli-histidina (6 restos de histidina consecutivos) en el C-terminal, que facilita la purificación de proteínas. Al insertar un gen de interés en el sitio de clonación múltiple (MCS) y en la fase de lectura adecuada, la secuencia del vector que codifica la cola de poli-histidina queda fusionada al extremo (en nuestro caso en el C-terminal) del gen de interés quedando marcada la proteína. Por otra parte, la expresión del gen está controlada por el

promotor regulable *T7lac* para inducir la expresión por IPTG. Cuando se introduce esta construcción en una cepa de sobre-expresión y se induce la expresión del gen por IPTG se sobre-expresa una gran cantidad de proteína marcada con la cola de poli-histidina, lo que facilita la purificación. Además contiene entre otros, un origen de replicación *f1* que permite la producción de ADN de cadena simple, un gen de resistencia a la kanamicina como marcador de selección, el promotor de la transcripción T7 y el terminador T7.

Se extrajo el plásmido pET28c(+), de la cepa en la cual fue cultivado de forma rutinaria (*E. coli* XL1blue), mediante una miniprep con el QIAprep® Spin Miniprep Kit de Quiagen siguiendo las instrucciones indicadas en el mismo. A continuación, se realizó una doble digestión, tanto del plásmido como de los fragmentos obtenidos de ADN de A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2662, A1S_2864 y AidA, para obtener los extremos *sticky-ends* o cohesivos compatibles. Las digestiones se llevaron a cabo con las enzimas FastDigest NcoI y EcoRI o BamHI (Thermo Scientific) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Después de la digestión se realizó una nueva electroforesis en gel de agarosa al 1% para eliminar los restos de cebadores y otros reactivos de la digestión y se purificaron las bandas de ADN correspondientes con el Gel Extraction Kit (Omega).

Tras las digestiones se insertaron los productos de las PCR ya cortados en el plásmido linealizado mediante una ligación enzimática utilizando la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para observar si la ligación ocurría como se esperaba y si el plásmido se había digerido correctamente, se realizó un control de la ligación con el plásmido sin el inserto de ADN. Se obtuvieron colonias recombinantes de todas las lactonasas amplificadas salvo de la A1S_2864, por lo que se continuó el proceso sin ella.

Una vez obtenidos los plásmidos con los distintos insertos de ADN, se transformaron células de *E. coli* XL1blue para la multiplicación de ADN de las secuencias de interés. Se hicieron células competentes de un cultivo de la cepa a transformar. De este modo se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo de 16 horas de *E. coli* XL1blue en 15 mL de medio LB, a 14.000 rpm durante 2 minutos. Tras eliminar al máximo el sobrenadante, se realizaron dos lavados del pellet en 1 mL de MOPS (ácido morfolinopropanesulfónico) 1mM-glicerol 10% pH 7,3 en hielo, centrifugando a 14.000 rpm, 2 min. Después se resuspendió el pellet en MOPS-glicerol con el mismo volumen de enrase y se añadieron de entre 2 a 5 μ L de la ligación del plásmido con el inserto de ADN. Se vertió el contenido en una cubeta de electroporación estéril de 90 μ L y 1mm Gap de VWR® anteriormente enfriada en hielo asegurándose de que se depositara en el fondo de la misma. Entonces se electroporaron las células en el ECM® 399 Electroporation System, BTX™ a 1000 V, 4 ms. Luego se añadió a la cubeta 1 mL de medio LB fresco y se dejó incubar una hora a 37°C, tras la que se vertieron 100 μ L en placas de LB suplementadas con el antibiótico kanamicina (30 μ g/mL) y se incubaron 24 h a 37°C. La ligación control del plásmido sin el inserto se electroporó también como control de la electroporación, de este modo si el plásmido estaba bien digerido no crecerían colonias en las placas.

Para asegurarnos de que las colonias recombinantes obtenidas tras la electroporación contenían el plásmido con el inserto, se realizó una electroforesis en gel de 1% de agarosa de una miniprep extraída con el kit de Quiagen de un cultivo en matraz de 15 mL de LB fresco de *E. coli* XL1blue transformado con pET28c(+) con el inserto a 37°C, 170 rpm y de la doble digestión de la misma miniprep con las enzimas de restricción correspondientes.

Adicionalmente se comprobó la presencia del inserto correspondiente al gen de interés en el plásmido mediante una PCR control de las colonias recombinantes con los

pares de cebadores correspondientes (Tabla 1) usados en la amplificación con las mismas condiciones de PCR, para comprobar la correcta construcción en el plásmido de las lactonasas de *A. baumannii*. Esta comprobación se observó mediante la electroforesis del producto de las PCR en un gel de agarosa al 1%.

Además para confirmar que los insertos de ADN estaban introducidos en el plásmido conservando la adecuada pauta de lectura se enviaron a secuenciar las minipreps de cultivos de 24 h de *E. coli* XL1blue transformado con pET28c(+)-*aIs_0383*, pET28c(+)-*aIs_1876*, pET28c(+)-*aIs_2662* y pET28c(+)-*aidA* en 15 mL de medio LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) a 37°C, 170 rpm; o bien los productos de amplificación mediante PCR de las colonias obtenidas con los cebadores específicos T7Fwd y T7Rev (Tabla 1) del vector utilizado. Las secuencias fueron analizadas al igual que en el apartado 7.3.

Las colonias recombinantes obtenidas elegidas se pasaron a placas nuevas de LB con kanamicina (30 µg/mL) para cultivarlas de forma rutinaria a 37°C en el laboratorio y paralelamente se congelaron en viales de congelación Cryoinstant Mixed (VWR®) a -80°C para su almacenamiento.

7.5. Sobre-expresión y purificación

Una vez insertadas las secuencias de las lactonasas de *A. baumannii* en el plásmido pET28c(+) y comprobar que se encontraban en la correcta pauta de lectura para poder expresar la cola de poli-histidina que añade el plásmido, se procedió a transformar la cepa de sobre-expresión *E. coli* BL21(DE3)plysS con el plásmido pET28c(+) con las secuencias de interés. Primero se realizó una miniprep con el kit de Quiagen de un cultivo de 24 h de 15 mL de *E. coli* XL1blue con pET28c(+) y el inserto en medio fresco LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) a 37°C, 170 rpm. A continuación se obtuvieron las células competentes de un cultivo de BL21(DE3)plysS de 24 horas en medio LB del mismo modo que en el apartado anterior, siendo transformadas con 2-5 µL del plásmido con el inserto.

Después de la electroporación se seleccionaron las colonias recombinantes obtenidas tras realizar un bioensayo de actividad en placas con el biosensor *C. violaceum* y asegurarnos de que la construcción del inserto en el plásmido transformado en la cepa de sobre-expresión presentaba actividad QQ. Para ello se sembraron al azar algunas de las colonias obtenidas en nuevas placas de LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) y se realizó un bioensayo de QQ (apartado 4) con células vivas de los cultivos de cada una. Las colonias recombinantes obtenidas se pasaron a placas nuevas de LB con kanamicina (30 µg/mL) para cultivarlas de forma rutinaria a 37°C en el laboratorio y paralelamente se congelaron en viales de congelación Cryoinstant Mixed (VWR®) a -80°C para su almacenamiento.

Se decidió purificar las 3 lactonasas disponibles, además de AidA, en la cepa de sobre-expresión debido a los óptimos resultados de degradación de AHLs obtenidos en los bioensayos realizados. La estrategia escogida para la purificación de las lactonasas se basa en la unión a una proteína de fusión (en nuestro caso la histidina que nos proporciona el plásmido pET28c(+)) para purificar mediante columnas de afinidad.

Antes de continuar y para verificar que la banda de la proteína de las lactonasas estaba presente en las cepas transformadas de *E. coli* BL21(DE3)plysS, que eran inducidas de forma correcta mediante IPTG y que no formaban cuerpos de inclusión en *E. coli*, lo que dificultaría su purificación, se realizó una electroforesis desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para ello se prepararon extractos celulares a partir de un cultivo de 50 mL de LB con kanamicina (30 µg/mL) a 37°C, 170 rpm, de una colonia de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con cada una de las tres proteínas y de una

colonia de *E. coli* BL21(DE3)plysS con el plásmido sin el inserto como control hasta alcanzar la densidad óptica (600 nm) de entre 0,6 y 1. Se le añadió IPTG (1 mM) o no y se mantuvo el cultivo a 16°C durante otras 5 h. El cultivo se centrifugó a 9000 rpm, durante 10 min, el pellet se resuspendió en 20 mL de PBS pH 6,7, se sonicó durante media hora y en hielo para evitar el exceso de calentamiento y por último la mitad de la muestra se centrifugó. Tras la electroforesis, el gel se tiñó con azul de coomasie y la imagen fue obtenida con el Gel Doc™ XR+ system de Bio Rad.

Para la purificación se prepararon extractos celulares de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3)plysS con el plásmido pET28c(+) con cada inserto, como acabamos de describir, induciéndolos con IPTG (1 mM) y al resuspender el pellet tras la sonicación y centrifugación en 20 mL de PBS, se le añadió la cantidad apropiada de imidazol recomendada por el fabricante, se ajustó el pH a 7,4 y se procedió a purificar a través de la columna de afinidad por histidina His GraviTrap™ affinity column (GE Healthcare) según las instrucciones indicadas por el fabricante. Los tampones necesarios para la purificación por la columna se prepararon mediante el His Buffer Kit (GE Healthcare). Además, se realizó una electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) de cada proteína purificada y dializada para comprobar que obteníamos las enzimas purificadas de forma correcta. El gel se tiñó con azul de coomasie y la imagen fue obtenida con el Gel Doc™ XR+ system de Bio Rad. Además, la concentración de proteína obtenida en cada purificación fue cuantificada con el espectofotómetro UV-Vis Spectrophotometer Q500 de Quawell y el peso molecular de cada una fue calculado teóricamente con la herramienta de cálculo de peso molecular de ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/).

8. Caracterización de las enzimas de QQ

8.1. Actividad QQ de las lactonasas de *A. baumannii*

Para poder caracterizar las enzimas purificadas primero se estableció la cantidad mínima activa de enzima necesaria para eliminar completamente una concentración de AHL de 10 µM en 24 h. Esta concentración se cuantificó mediante bioensayo de producción de violaceína en medio sólido para las moléculas señal C6 y C12-HSL con las cepas bioindicadoras de *C. violaceum* CV026 (McClellan et al. 1997) y VIR07 (Moroshi et al. 2008a). Se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) en PBS pH 6,7 del stock de una solución de cada enzima purificada de concentración conocida. Estas diluciones se incubaron con cada AHL a una concentración final de 10 µM durante 24 h a 22°C y 200 rpm. Después se tomaron 100 µL de cada dilución y se procedió al análisis de actividad QQ del mismo modo que en el apartado 4. Sobre esta base, en todos los ensayos de caracterización se utilizó una concentración correspondiente a 10 veces la concentración mínima activa de cada proteína a las 24 horas sobre C12-HSL.

La especificidad de las lactonasas de *A. baumannii* ATCC17978, se analizó mediante bioensayo en pocillo en medio sólido para determinar la capacidad de cada lactonasa de degradar distintas señales (C8-HSL, *N*-decanoil-L-homoserín lactona o C10-HSL, OC10-HSL, OHC10-HSL, C12-HSL, OC12-HSL, OHC12-HSL, OC13-HSL, *N*-tetradecanoil-L-homoserín lactona o C14-HSL y OC14-HSL). Cada molécula señal se incubó por separado (10 µM) durante 24 h, a 200 rpm, en PBS pH 6,7, a una concentración final de la proteína purificada 10 veces mayor que la concentración mínima activa. Tras el tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 100 µL de cada mezcla de reacción para analizar la actividad QQ en bioensayo en las mismas condiciones que en el apartado 4. Como control se usó el PBS suplementado con la misma cantidad de cada señal procesado del mismo modo.

8.2. Especificidad y cinética de degradación de AHLs de Aii20J

Con el objetivo de asegurar la capacidad de la lactonasa Aii20J de eliminar de las señales de QS producidas por *A. baumannii* ATCC17978 se analizó mediante bioensayo en pocillo en medio sólido la capacidad de Aii20J de hidrolizar distintas AHLs (OC10, OHC10, OC12, OHC12, OC13, OC14, OHC14 y C16-HSL). Cada molécula señal se incubó por separado (10 μ M) durante 24 h en PBS pH 6,7 a una concentración final de la proteína purificada de 20 μ g/mL a 200 rpm. Tras el tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 100 μ L de cada mezcla para analizar la actividad QQ en bioensayo en las mismas condiciones que en el apartado 4. Como control se usó el PBS suplementado con la misma cantidad de cada AHL probada procesado del mismo modo.

Se usó HPLC-MS para evaluar la cinética de degradación de AHLs (C12, OC12 y OHC12-HSL) de la enzima purificada Aii20J. Para ello se incubó a una concentración de 20 μ g/mL en PBS pH 6,7 con cada AHL (concentración final de 50 μ M) a 22°C, 200 rpm. A distintos tiempos de incubación (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 60 min) se tomaron alícuotas de 200 μ L por triplicado de todos los tubos para realizar una extracción orgánica de las mezclas de reacción, extrayendo tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo (200 μ L). El solvente se recuperó y evaporó mediante flujo de nitrógeno en baño a 50°C y el extracto seco obtenido se resuspendió en 400 μ L de acetonitrilo para su posterior análisis y cuantificación de la concentración de la señal restante por HPLC-MS (Romero et al. 2014). Los controles se realizaron con el PBS suplementado con la misma cantidad de señal y se procesaron y extrajeron orgánicamente del mismo modo. El análisis en HPLC-MS fue realizado en las mismas condiciones indicadas en el apartado 4.1.

9. Ensayo de adherencia celular

Cultivos de *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante Δ abai de ATCC17978 se inocularon por duplicado a una densidad óptica (600 nm) de 0,01, en una placa especial de cristal de 6 pocillos en LB con baja sal (0,5%), a 37°C, durante 72 horas. Además, la enzima de QQ Aii20J se añadió a *A. baumannii* ATCC17978 a una concentración final de 20 μ g/mL al inicio del experimento, como una tercera condición. En el tiempo de incubación se fotografiaron los pocillos cada 15 segundos con una cámara acoplada a una lente de microscopio (68X) con las que se generó un video con el software del programa ImageJ.

10. Formación de biopelícula de *A. baumannii*

10.1. Formación de biopelícula en sistemas clásicos

Cultivos de *Acinetobacter* spp. de 17 h obtenidos a partir de una colonia de cada especie/aislado, se inocularon por triplicado o en 6 réplicas, en LB, LB con baja proporción de sal o LBM, a una densidad óptica (600 nm) de 0,05 a 37°C, en placas microtiter de 96 o 24 pocillos de poliestireno, transparentes o negras opacas (para el ensayo de resazurina), con 200 μ L de cultivo; en eppendorf de 1,5 mL con un volumen total de 1 mL o en eppendorf de 5 mL con 2 mL de cultivo. Los cultivos se mantuvieron durante 24, 48 o 72 h a 37°C, en estático (placas y tubos eppendorf) o en un agitador que permite la rotación de 360°C (tubos eppendorf). La lactonasa de QQ Aii20J se añadió a una concentración final de 20 μ g/mL cuando fue necesario. La formación de biopelícula se cuantificó mediante ensayo de cristal violeta (Muras et al. 2018b) o resazurina (Vandeveldt et al. 2014). El crecimiento planctónico se midió paralelamente, a densidad óptica de 600 nm, en el mismo sistema utilizado y en las mismas condiciones, en agitación, para determinar si había inhibición de crecimiento.

10.2. Formación de película en la interfase aire-líquido

Los cultivos de *Acinetobacter* spp. se inocularon por triplicado a una densidad óptica (600 nm) de 0,01 en tubos de polipropileno de 10 mL de 14,17 mm de diámetro interno o tubos de cristal de 10 mL y 14 mm de diámetro, en un volumen total de 5 ml, en estático o en agitador de 360°C, con LB o LBM, en luz u oscuridad y a distintas temperaturas (25 y 37°C), durante 72 h. La formación de *pellicle* (película o nata) se pudo observar a simple vista. La película formada en la interfase se extrajo para su cuantificación mediante densidad óptica o para cuantificación de la película formada en forma de anillo en las paredes del tubo mediante cristal violeta. Para la extracción de la película, se añadió 1 mL de etanol en el tubo justo por debajo de la película, que fue extraída con la ayuda de una pipeta Pasteur y resuspendida en PBS. Entonces, se midió la densidad óptica a 600 nm (Giles et al. 2015).

10.3. Ensayo de cristal violeta

Tras eliminar el medio de cultivo, se añadió el mismo volumen de agua destilada para lavar con cuidado la biopelícula y eliminar las células planctónicas que quedasen en suspensión. Una vez eliminada el agua, se añadió el mismo volumen de etanol absoluto para fijar la biopelícula durante 15 min, tras los que se eliminó y se dejó secar. A continuación, se añadió un mismo volumen de cristal violeta (Panreac) al 0,04% durante 20 min. El exceso de cristal violeta se eliminó realizando dos lavados con agua y la biopelícula teñida se disolvió en ácido acético al 33%. La cantidad de biopelícula formada se determinó mediante la cuantificación de la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm (Muras et al. 2018b).

10.4. Ensayo de resazurina

La resazurina es una tinción azul que es reducida por el metabolismo activo de las células viables en el compuesto fluorescente de color rosa denominado resorufina (Pantarella et al. 2013). Una vez eliminadas con cuidado las células no adheridas con el medio de cultivo, se lavó la biopelícula con PBS. Después se añadió el mismo volumen de una solución de resazurina (Sigma) a una concentración de 0,001% diluida en el mismo medio de cultivo utilizado (Vandeveldt et al. 2014). La tinción se incubó durante media o una hora a 37°C y en oscuridad. Una vez pasado el tiempo de incubación se cuantificó la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$ 570 nm, $\lambda_{\text{emisión}}$ 590 nm).

10.5. X-CELLigence®

La formación de biopelícula también se cuantificó mediante el X-CELLigence® (ACEA, Biosciences Inc.). Este sistema monitoriza en tiempo real la adhesión de células bacterianas al fondo de los pocillos de una placa mediante la cuantificación de la impedancia producida por la biopelícula sobre la corriente que circula por circuitos situados en el fondo de los pocillos (Cihalova et al. 2015, Ferrer et al. 2016, Muras et al. 2018a). Se inocularon placas especiales de 16 pocillos (E-plates de ACEA, Biosciences Inc.) con un cultivo de *Acinetobacter* spp. de 17 h a una densidad óptica (600 nm) de 0,05 en 100, 150 o 200 μ L de medio LB. El sistema se incubó a 37°C durante 24 o 48 h, realizando mediciones de la impedancia cada 15 min.

10.6. Bioflux™

El sistema BioFlux™ 200 (Fluxion Biosciences Inc., CA) consiste en una red de microcanales situados entre dos pocillos de placas de 48 pocillos por los que se establece un flujo laminar de medio de cultivo desde el pocillo de entrada al canal y el

pocillo de salida mediante una bomba electroneumática (Nait Chabane et al. 2014b). De esta forma se pueden cultivar biopelículas bacterianas en los microcanales tras inoculación y fijación de células bacterianas en la superficie del canal. Además, una ventaja de este tipo de sistemas es que las placas multipocillo utilizadas, poseen ventanas entre los pocillos que permiten la observación en tiempo real de la formación de biopelícula en los microcanales mediante microscopía. El sistema se inoculó con un cultivo de 17 de *A. baumannii* ATCC17978 o el mutante $\Delta abal$ de ATCC17978 a una densidad óptica (600 nm) de 0,05 o 0,1 en LB, en LB con baja concentración de sal (0,5%), en LB con baja sal diluido 1/10, en el medio mínimo Tris-M9 (Tomaras et al. 2003), en el medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Sigma) o en Mueller-Hinton (Difco). El sistema se mantuvo sin flujo durante 1 o 2 h, a 37°C, para permitir la adherencia celular a la superficie del microcanal y luego se estableció una fuerza de flujo de 1 o 3 dyn/cm² durante 24 h, en las que se obtuvieron las imágenes de *A. baumannii*. Para poder observar las células con microscopía confocal se añadió al inicio al medio de cultivo la tinción SYTO®9 (Invitrogen) a una concentración de 5 µM.

10.7. Formación de biopelícula en un biorreactor de biopelícula de interfase

Debido a que las mejores condiciones para la obtención de biopelícula en *Acinetobacter* parecían ocurrir en la interfase líquido-aire en los diferentes modelos empleados, se exploró el uso de un nuevo sistema (Biorreactor de biopelícula bacteriana de interfase) que permite una alta aireación de la superficie de crecimiento de una biopelícula. En estos momentos este sistema se encuentra en proceso de preparación de su patente por lo que solo lo explicaremos en términos generales. Se realizaron varios experimentos con *A. baumannii* ATCC17978 (6 en total con ATCC17978 y 4 con el mutante $\Delta abal$). Este nuevo sistema consiste en cultivar biopelícula sobre portaobjetos y cubreobjetos de vidrio (borosilicato) en un biorreactor de biopelícula con inmersión y emersión constante de las superficies colonizadas por las células. Se utilizó medio LB con baja sal (0,5%) y la biopelícula se cultivó durante 5 o 6 días, a 37°C, con renovación del medio de cultivo fresco y precalentado cada 24 h. Las células se inocularon a una densidad óptica (600 nm) de 0,05 en 1,2 L de medio de cultivo, con la primera hora del primer día sumergido continuamente para permitir la adherencia celular antes del proceso de inmersión/emersión. La formación de biopelícula se determinó sobre portaobjetos de borosilicato de 76x26 (Menzel-Glaser, Thermo Scientific), por duplicado, que se pesaron antes de esterilizarlos mediante autoclave para cada experimento y se volvieron a pesar una vez secos, a las 24 horas de extraerlos del biorreactor (cada día) para la cuantificación de biomasa adherida a superficie. Se utilizaron a su vez cubreobjetos de borosilicato de 20x20 mm (VWR), en los cuales las células de *A. baumannii* se tiñeron para monitorizar el crecimiento de la biopelícula con el microscopio confocal al mismo tiempo que el pesado.

Para determinar la inhibición de formación de biopelícula se añadió un extracto celular a una concentración final de 20 µg/mL, con una concentración mínima activa de 4 µg/mL, cada día (3 experimentos en total), obtenido a partir un cultivo de 50 mL de LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) de una colonia de *E.coli* BL21(DE3)plysS con el plásmido pET28c(+)-*aii20J* incubándolo a 170 rpm, 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (600 nm) del cultivo de entre 0,6-1. A este cultivo se le añadió IPTG a una concentración 1 mM para inducir la sobre-expresión de *Aii20J* y se dejó incubar durante 3 h a 16°C. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 9000 rpm, se lavó el pellet con PBS 6,7 pH para eliminar los posibles restos del medio de cultivo y finalmente se resuspendió en 20 mL de PBS pH 6,7 y se filtró por 0,2 µm.

Además, se realizó un extracto control a partir de una colonia de *E. coli* transformado con el plásmido pET28c(+) sin el inserto, del cual se añadió cada día, el mismo volumen que el extracto de Aii20J, al medio de cultivo del biorreactor. La cantidad de proteína se cuantificó mediante el método de Lowry (Lowry et al. 1951, modificado por Herbert et al. 1971) siguiendo el protocolo y se comprobó la pureza de Aii20J en el extracto de *E. coli* transformado mediante electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Tras la electroforesis, el gel se tiñó con azul de coomasie y la imagen fue obtenida con el Gel Doc™ XR+ system de Bio Rad. La actividad QQ del extracto realizado de Aii20J en *E. coli* y del extracto control se evaluó mediante bioensayo de inhibición de producción de violaceína en pocillo, contra la señal C12-HSL y con el biosensor *C. violaceum* VIR07, al igual que se indica en el apartado 4.

Para la suplementación del mutante de la sintasa con AHL, se realizaron dos experimentos añadiendo al medio de cultivo cada día OHC12-HSL a una concentración de 10 μ M.

10.8. Análisis mediante microscopía

Se utilizó la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen), que consiste en las tinciones SYTO®9 y yoduro de propidio, para distinguir las células vivas (en verde) de las muertas (en rojo). El yoduro de propidio penetra solo en las membranas dañadas y en los lugares donde coincide con SYTO®9, apaga la señal verde, por lo que solo se visualiza el colorante rojo. Una vez formada la biopelícula, se retiraron los cubreobjetos y se tiñeron con una concentración final de 5 μ M y 30 μ M, de SYTO®9/yoduro de propidio, respectivamente. La tinción YOYO™-1 iodide (Invitrogen) se usó para teñir ácidos nucleicos a 3,33 ng/ μ L y la tinción lipófila FM™4-64 (Invitrogen) a 1 μ g/mL. Para la observación microscópica de la biopelícula se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5 X con el objetivo HC PL APO 10x/0.4 CS y un microscopio confocal Carl Zeiss AG con los objetivos EC Plan-Neofluor 5x/0.16M27, EC Plan-Neofluor 10x/0,30M27 y C-Apochromat 40X/1.20W. Como mínimo se realizaron 3 Z-stacks individuales de cada imagen adquirida. Para procesar las imágenes se utilizaron los programas ZEN 2009 y LAS X. Para la señal de SYTO9® y YOYO™-1 iodide se utilizó el láser de 488 nm y para el yoduro de propidio y FM™4-64 el láser de 555 nm. Además, se realizaron controles de cada tinción por separado al microscopio confocal.

10.9. Formación de biopelícula en el modelo de adhesión activa

Este modelo consiste en una modificación del modelo de adhesión activa de formación de biopelícula denominado *Amsterdam active attachment model* o *AAA-model* (Exterkate et al. 2010), sobre cubreobjetos de vidrio de 18x18 mm (Menzel-Glaser, Thermo Scientific). El modelo consiste en sumergir los cubreobjetos en el medio de cultivo LB con baja sal (0,5%), depositado en una placa microtiter de 12 pocillos y cambiando el medio cada día. Los cultivos de 17 h de *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante Δ abaI a 37°C se usaron como inóculo, por triplicado, a una densidad óptica (600 nm) de 0,05. Al cuarto día, la biopelícula de dos de los cubreobjetos de cada condición se tiñó con cristal violeta para su cuantificación y la tercera réplica se tiñó con SYTO®9 y yoduro de propidio (5 μ M/30 μ M) para observar mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para determinar la inhibición de formación de biopelícula se añadió al medio de cultivo de *A. baumannii* ATCC17978 cada día, la enzima Aii20J purificada a una concentración final de 20 μ g/mL (Mayer et al. 2015), el control de la purificación de *E. coli* con el plásmido pET28c(+) sin el inserto, purificado igual que en el apartado 10.7, añadido al mismo volumen que la

enzima Aii20J, el extracto de *E. coli* transformado con Aii20J a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o el mismo volumen del extracto control sin el inserto de *aii20J*. Se realizaron dos experimentos independientes con este modelo.

11. PCR cuantitativa

Para determinar los niveles de expresión de los genes seleccionados, se realizó una PCR cuantitativa usando el ADNc de los cultivos de *A. baumannii* ATCC17978 incubados a 37°C en LB o LB con baja sal con o sin agitación. Las células de *A. baumannii* ATCC17978 se recogieron a las 7 h de cultivo. Para evaluar el efecto de la adición de AHL sobre la expresión génica, la OHC12-HSL se añadió a tiempo cero y a las 6 h de cultivo durante una hora más de incubación a una concentración de 10 μM , en medio LB, a 37°C en agitación (170 rpm). Las muestras se mezclaron con un mismo volumen con el agente protector RNAlater solution (Invitrogen) para estabilizar el ARN, se centrifugaron 6000 rpm durante 10 min y se congelaron para su posterior extracción. Tras resuspender el pellet en tampón Tris-EDTA (30 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) suplementado con 15 mg/mL de lisozima y 2 mg/mL de proteinasa K, el ARN total se extrajo utilizando el RNase Mini Kit (Quiagen) y se trató con Turbo DNA-free DNase kit (Ambion) según las indicaciones del fabricante. Mediante PCR con 1 μL de ARN purificado y posterior electroforesis en gel de agarosa (1%), se evaluó la posible contaminación de ADN. La reversotranscripción se realizó con la RevertAid Reverse Transcriptase y *random hexamers* (Thermo Fisher Scientific), usados para sintetizar el ADNc de acuerdo con el protocolo. La concentración final de ARN se cuantificó mediante un espectrofotómetro (UV-Vis Spectrophotometer Q500) de Quawell.

La PCR cuantitativa se llevó a cabo usando FastStart SYBR Green Master (Roche) con 300 nM de cebadores y 2 ng de ADNc por cada 20 μL de mezcla de reacción conteniendo 1X FastStart SYBR Green Master. Los oligonucleótidos usados aparecen en la tabla 1. La eficiencia de cada par de cebadores se determinó llevando a cabo varias diluciones del ADNc y la especificidad fue verificada mediante análisis de las curvas de hibridación (1 ciclo de 95°C durante 1 min y otro ciclo de 60°C durante 1 min, seguido de hibridación con incrementos de 0,5°C cada 10 s hasta 95°C). A continuación, los análisis de la PCR cuantitativa se realizaron con un iCycler iQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del protocolo: 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C, 20 s; 56°C, 30 s y 72°C, 40 s. Las PCRs cuantitativas se realizaron por triplicado y se incluyeron muestras sin reverso transcriptasa o ARN como controles negativos. Los datos se analizaron usando el software de iQ5 Optical System (Bio-Rad) y la cuantificación de los niveles de expresión se determinó mediante el método $\Delta\Delta C_T$, normalizando los niveles de transcripción al *housekeeping rpoB* (Livak y Schmittgen 2001).

12. Estadística

Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba *t* de Student para las medias de las muestras independientes ($P < 0,05$).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO 1. Motilidad y quorum sensing en *A. baumannii*

Antecedentes

Entre los mecanismos implicados en la virulencia del patógeno nosocomial *A. baumannii*, es de especial relevancia la motilidad. Aunque es un microorganismo no motil que carece de flagelo, en *Acinetobacter baumannii* se han descrito dos clases de migración según la concentración de agar usada: la motilidad de tipo *twitching*, una migración en la interfase entre la capa de agar y una superficie sólida como el fondo de una placa Petri, que se produce con concentraciones de 1% de agar (Mussi et al. 2010, Harding et al. 2013), y la motilidad asociada a superficie, con concentraciones de entre 0,2 y 0,5% de agar (Mussi et al. 2010, Clemmer et al. 2011, Skiebe et al. 2012, Harding et al. 2013).

La motilidad asociada a superficie en *A. baumannii* presenta una regulación multifactorial en la cual intervienen diversas proteínas como el sistema regulador de dos componentes BfmSR que controla la expresión del operón *csu*, esencial para la biosíntesis de pili tipo I, la sensora quinasa GacS del sistema de dos componentes GacSA, el sensor de luz azul *blsA*, la proteína reguladora de tipo histona H-NS, el AMPc o el QS (Tomaras et al. 2008, Mussi et al. 2010, Clemmer et al. 2011, Eijelkamp et al. 2013, Cerqueira et al. 2014, Giles et al. 2015). Se cree que los pili de tipo IV también son esenciales para la motilidad de tipo *twitching* (Harding et al. 2013), pero aún no está claro si son estrictamente necesarios en la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* (Clemmer et al. 2011).

Los resultados disponibles demuestran que el QS mediado por AHLs juega un papel crucial en el control de la motilidad de *A. nosocomialis*, debido a que mutantes defectivos de QS en *A. nosocomialis* M2 y *A. nosocomialis* ATCC17903^T alteraron la motilidad en superficie (Clemmer et al. 2011, Oh y Choi 2015). Las especies del género *Acinetobacter*, incluidas *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2, presentan un sistema de QS LuxI/LuxR clásico, constituido por la sintasa *abaI* y el receptor *abaR* (Bhargava et al. 2010).

Aunque varios estudios han descrito la generación de señales de QS en este género, sin identificarlas claramente en casi todos los casos (Niu et al. 2008, Bhargava et al. 2010, Kang y Park 2010a, Chan et al. 2011, 2014, Bitrian et al. 2012, How et al. 2015), y con la OHC12-HSL (*N*-hidroxidodecanoil-L-homoserín lactona) como principal molécula identificada en *A. nosocomialis* M2 (Niu et al. 2008), el perfil de AHLs y los factores que controlan la producción de las señales en *A. baumannii* ATCC17978 y el papel que desempeña exactamente el QS en *Acinetobacter*, pudiendo afectar a los mecanismos de virulencia en los que interviene, todavía se desconoce.

Con el objetivo de comprender la influencia del mecanismo regulador del QS sobre la virulencia de *A. baumannii* ATCC17978, en la cual nos centraremos a lo largo de todo este trabajo, en este capítulo se estudió el perfil de señales de QS de *A. baumannii* ATCC17978 y la relación con la motilidad asociada a superficie. *A. baumannii* M2, reclasificada recientemente como *A. nosocomialis* M2 (Carruthers et al. 2013) se utilizó como especie de referencia en este estudio, pues la mayoría de la bibliografía relacionada con *Acinetobacter* aparece referida a esta especie. Los resultados también se compararon con varios aislados clínicos de *A. baumannii* y *A. calcoaceticus*. Algunos autores han descrito la relación entre las bombas de expulsión de antibióticos y la expulsión de AHLs exógenas en otros patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* para seleccionar específicamente su señal AHL determinada y unirse con su receptor (Minagawa et al. 2012). Con la hipótesis de que en *A. baumannii* pudiera estar

ocurriendo lo mismo, también decidimos caracterizar la producción de señales de QS del mutante $\Delta adeB$ de *A. baumannii* ATCC17978, que codifica para el transportador multidrogas, componente principal de la bomba de eflujo AdeABC, una de las mejor caracterizadas en *A. baumannii* (Marchand et al. 2004). Adicionalmente, se investigó el efecto de la lactonasa termoestable de amplio espectro Aii20J aislada de la bacteria marina *Tenacibaculum* sp. 20J (Mayer et al. 2015), y los mutantes de las sintasas de AHLs para el estudio del impacto del QS sobre la motilidad asociada a superficie de esta especie bajo distintas condiciones.



Resultados

1. QS en *A. baumannii*

1.1. Producción de señales AHLs en *A. baumannii*

En primer lugar, para evaluar la actividad QS de *A. baumannii*, se realizó un ensayo de producción de violaceína por difusión con los biosensores de AHLs *Chromobacterium violaceum* CV026 y VIR07 (McClellan et al. 1997, Morohoshi et al. 2008a), en el que no se observó inducción de la producción de violaceína en ninguna especie, cepa o aislado (Figura 5A). Estos biosensores son incapaces de producir el pigmento violeta denominado violaceína sin la adición de AHLs exógenamente. Sin embargo, puesto que en la literatura publicada está descrito que otras especies del género *Acinetobacter* producen mayoritariamente la señal de QS de cadena larga OHC12-HSL (Niu et al. 2008), comprobamos mediante bioensayo en pocillo el límite de detección de nuestro biosensor (Figura 5C). Como se observa en la figura 5C, el sensor solo logra detectar la OHC12-HSL a partir de concentraciones mayores que 10 μM , dificultando la detección de producción de menores cantidades de esta señal.

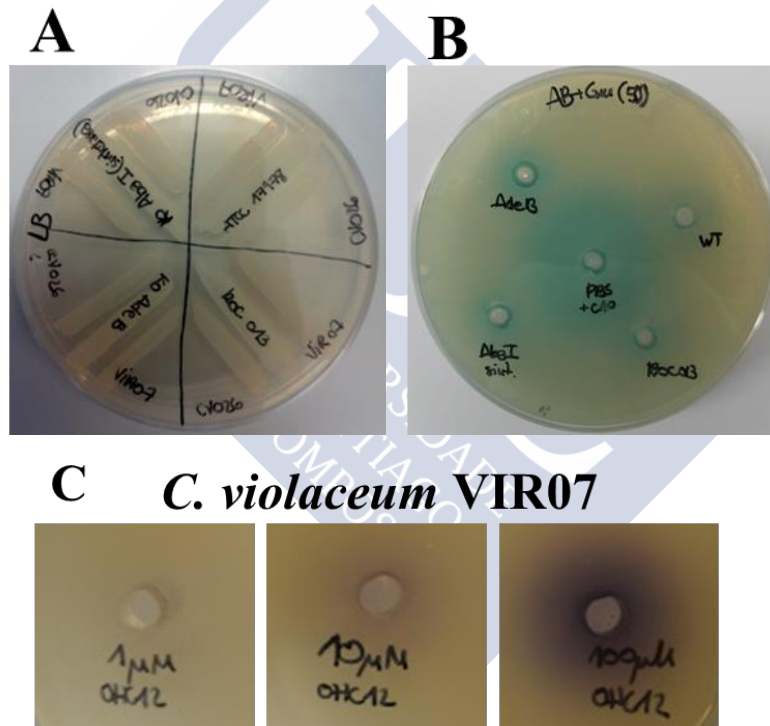


Figura 5. A) Bioensayo de difusión de las cepas de *A. baumannii* ATCC17978, $\Delta abal$, $\Delta adeB$ y del aislado clínico *A. baumannii* Ab1 (ROC013) con *C. violaceum* CV026 y VIR07. B) Bioensayo de producción de AHLs con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 suplementado con X-gal (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En el pocillo central se encuentra el control positivo de la señal C10-HSL en PBS a 10 μM . Este biosensor solo produce la coloración azul en presencia de AHLs añadidas exógenamente. C) Bioensayo en pocillo de producción de violaceína de OHC12-HSL en PBS a 1, 10 y 100 μM con el biosensor *C. violaceum* VIR07. Solo en los pocillos donde se encuentra la AHL a la concentración a la cual el biosensor es capaz de detectarla, éste es capaz de producir el pigmento violaceína.

En vista de que las cepas de *A. baumannii* pudieran producir otras AHLs distintas de las que detecta el *C. violaceum* o que los biosensores (CV026 y VIR07) no las detectaran a tan poca concentración, se realizaron varios ensayos de producción de señales de QS con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 con extracciones de AHLs de los sobrenadantes de cultivos agitados de las distintas especies y cepas de

Acinetobacter (Figura 5B). A pesar de probar distintos volúmenes de extracción y a diferentes horas del cultivo, concentrados y resuspendidos en tampón PBS, todas las cepas/especies de *Acinetobacter* probadas produjeron la coloración característica azulada, producto de la reacción del X-gal con la β -galactosidasa producida por el biosensor en presencia de AHLs, en comparación con el control (en la figura 5B se muestran algunas de ellas). Sin embargo, el mutante de la sintasa de AHLs *abaI* también produjo algo de color azul. De forma complementaria, se realizaron cromatografías en capa fina con las mismas extracciones de AHLs resuspendidas en etiloacetato y posteriormente recubiertas con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4. La aparición de un halo en el mutante Δ *abaI* generó dudas sobre los resultados (datos no mostrados), ya que la respuesta podría deberse a la interacción de otras moléculas semejantes a las AHLs producidas por la cepa que pudieran reaccionar con el biosensor y producir el precipitado azul derivado de la reacción entre la β -galactosidasa y el X-gal o que la inestabilidad del X-gal produjera en ambos casos el color característico al degradarse de manera espontánea.

En vista de la imposibilidad de obtener resultados fiables con los biosensores se procedió al análisis de las señales mediante HPLC-MS.

1.2. Identificación del perfil de AHLs en *A. baumannii* por HPLC-MS

Con el objetivo de confirmar e identificar inequívocamente las señales de QS en el género *Acinetobacter*, se analizaron mediante HPLC-MS los sobrenadantes extraídos anteriormente de cultivos en agitación y utilizados para los bioensayos y las cromatografías con el biosensor *A. tumefaciens*. Sin embargo, en estos análisis no se detectó ninguna señal AHL. En vista de que no se lograba obtener ningún dato con esta metodología, contrastando con las evidencias observadas de la producción de AHLs en la literatura publicada, se realizaron diferentes modificaciones en las condiciones de la extracción. En primer lugar, se realizó una nueva extracción de los sobrenadantes de los cultivos tomando muestras en más puntos de la curva de crecimiento (0, 3, 8, 12, 17 y 24 h) para analizar mediante HPLC-MS, sin obtener de nuevo ningún resultado. Luego se decidió comparar el análisis mediante HPLC-MS de los sobrenadantes extraídos acidificados durante 24 h con sobrenadantes sin acidificar. La acidificación de los sobrenadantes, para evitar la posible degradación espontánea de las AHLs debido a pHs alcalinos (Yates et al. 2002) y recuperar las posibles señales de QS degradadas por lactonasas, tampoco permitió la detección de ninguna señal. Ya que en la bibliografía se había descrito actividad QQ en el género *Acinetobacter* (Kang et al. 2004, Chan et al. 2011, Kim et al. 2014, Ochiai et al. 2014) y con la hipótesis de que posibles restos celulares o enzimas de QQ pudieran estar actuando durante las 24 h de la acidificación de los sobrenadantes, se aumentó el tiempo de la centrifugación en el protocolo de extracción y los sobrenadantes se filtraron por 0,20 μ m para eliminar cualquier resto celular residual que pudiera estar actuando contra las señales de QS. Por otro lado, también se aumentó el volumen de las extracciones. Sorprendentemente, no se pudieron detectar AHLs en ningún punto de la curva de crecimiento de los cultivos agitados de ninguna especie/aislado estudiado de *Acinetobacter*.

Llegados a este punto, se decidió modificar las condiciones de cultivo. Dado que en la bibliografía se sugería un rol regulatorio del QS mediado por AHLs en la motilidad asociada a superficie de *A. nosocomialis* (Clemmer et al. 2011, Oh y Choi 2015) y con la hipótesis de que *Acinetobacter* podría producir una mayor cantidad de señal en condiciones que facilitasen la fijación a una superficie, se realizó una prueba de extracción de AHLs con cultivos en agitación y estáticos de *A. baumannii* ATCC17978. Solo los cultivos no agitados, que facilitarían la adhesión de las células a superficie,

permitieron la detección de señales de QS. Se procedió entonces a la identificación de las señales de *A. baumannii* ATCC17978 y de la especie de referencia *A. nosocomialis* M2 mediante HPLC-MS en condiciones estáticas. La presencia de señales solo en cultivos estáticos explicaría la incapacidad de los biosensores de violaceína para detectar actividad en los experimentos iniciales. Debido a los indicios descritos en la bibliografía de que el medio de cultivo podría afectar a la producción de señales de QS de *Acinetobacter* (González et al. 2001), la identificación se realizó en el medio de cultivo LB (1% NaCl, 1% triptona y 0,5% de extracto de levadura) y en LBM (0,5% NaCl, 0,2% triptona y 0,1% de extracto de levadura) para observar el posible efecto de los nutrientes en la producción de AHLs, y en el medio LB tamponado con PIPES (200 mM, pH 6,0) para prevenir la posible lactonólisis espontánea de las señales (Yates et al. 2002). Hay que añadir que se realizó otra extracción en el medio de cultivo MMA, un medio mínimo con distintas sales, a las 17 horas donde se había descrito detección de señales de QS en *A. calcoaceticus* BD413 (González et al. 2001). A partir de estos cultivos en los distintos medios, se extrajeron volúmenes de 100 mL de sobrenadantes recogidos en distintos puntos de la curva de crecimiento (0, 6, 12, 17, 24, 36 y 48 h) que fueron resuspendidos en 1 mL de acetonitrilo, resultando en la detección de un complejo perfil de AHLs únicamente en cultivos estáticos (Tabla 2, figuras 6, 7 y 8).

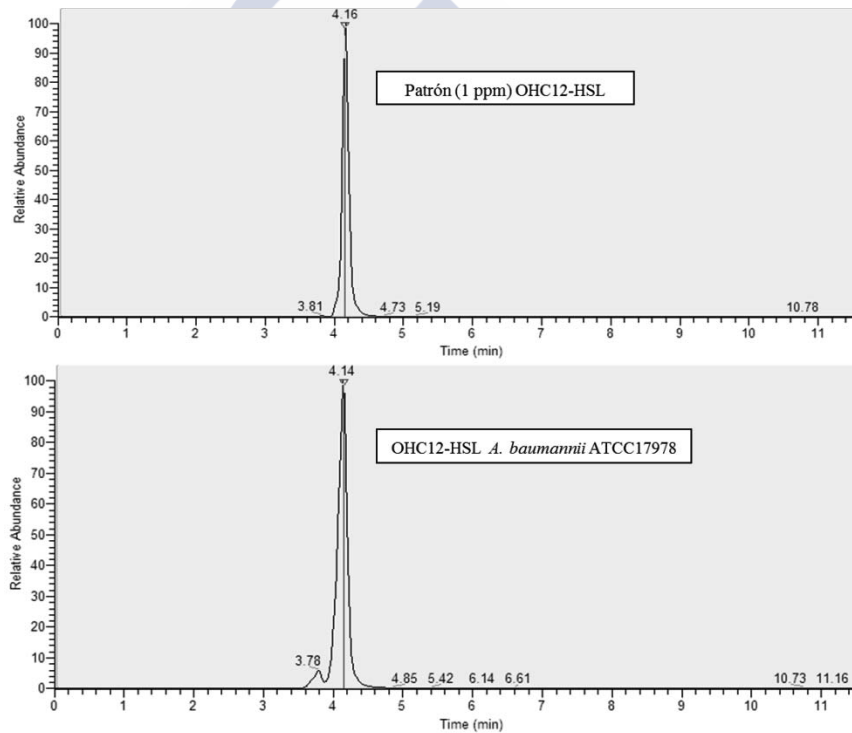


Figura 6. Cromatograma de iones (TIC) de la señal de QS OHC12-HSL sintética utilizada como patrón de referencia (1 ppm) y de la señal OHC12-HSL encontrada en sobrenadantes extraídos de *A. baumannii* ATCC17978 en cultivos sin agitación en medio LB a 17 h de la curva de crecimiento.

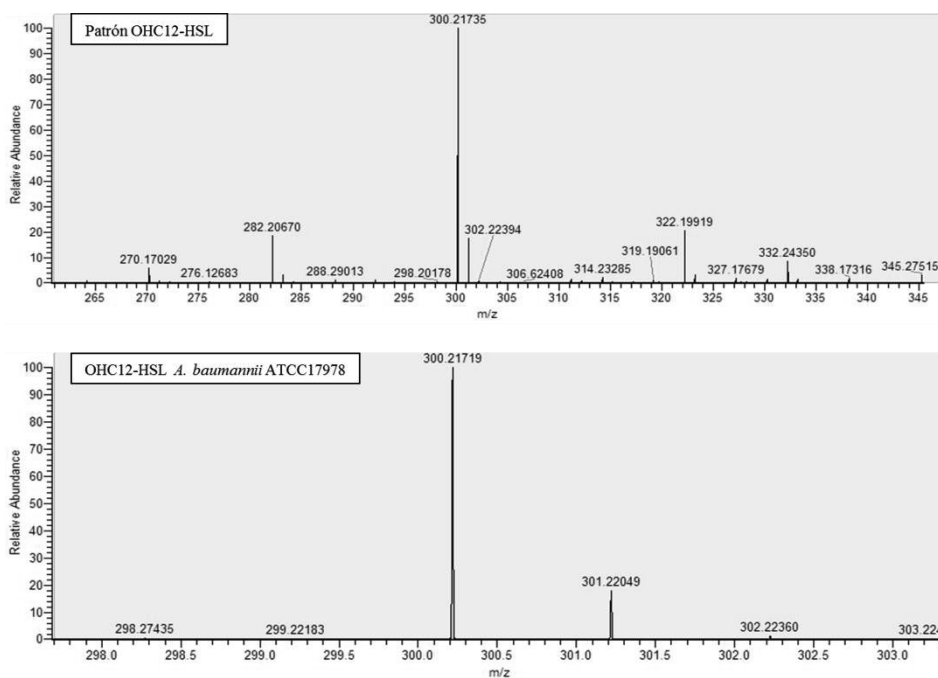


Figura 7. Identificación de la señal OHC12-HSL en *A. baumannii* ATCC17978 en los análisis de HPLC-MS. Picos del espectro de masas en la zona de interés obtenido para el patrón de OHC12-HSL sintética y el del pico correspondiente para *A. baumannii* ATCC17978.

Como se observa en la tabla 2, la señal producida mayoritariamente por ambas especies fue OHC12-HSL, la cual fue identificada inequívocamente basándose en su espectro de masas (Figuras 6 y 7).

A pesar de la alta concentración de OHC12-HSL detectada en los sobrenadantes de ATCC17978 en LB comparado con M2, el patrón de producción de AHL fue muy similar en ambas especies. En *A. baumannii* ATCC17978 se alcanzó una concentración máxima a las 17 h de cultivo de alrededor 30 ng/mL (102,675 nM), similar en LB y LBM. A partir de este punto de la curva de crecimiento, la producción de la señal comienza a descender hasta ser indetectable a partir de las 36 h (Figura 8A). El control del pH en el medio mediante la adición del tampón PIPES para evitar la degradación espontánea de las señales de QS, permitió alcanzar mayores concentraciones de OHC12-HSL, detectándose más de 60 ng/mL en los sobrenadantes (215,634 nM) a las 24 h. Sin embargo, el medio tamponado no logró evitar la desaparición de la señal con el tiempo, indicando la posible existencia de actividad enzimática de degradación específica de las señales de QS. En cuanto a *A. nosocomialis* M2, la producción de OHC12-HSL fue ligeramente menor en el medio de cultivo LB (Figura 8B). Además, la cinética de producción en el medio LBM fue también más rápida alcanzando el pico máximo de la señal a las 12 h en comparación con el LB en el cual no se alcanzó hasta las 17 h. Al igual que en *A. baumannii*, se produjo una caída importante de la producción de la señal en M2 disminuyendo rápidamente hasta ser indetectable tras las 24-36 h de cultivo. Sorprendentemente y a diferencia de lo observado en ATCC17978, el control del pH del medio de cultivo manteniéndolo por debajo de 6,5 no evitó la caída de las AHLs (Figura 8), sugiriendo una posible y mayor degradación de AHLs en esta especie. No se observaron diferencias en las curvas de densidad de cultivo en medio LB y en medio LB tamponado para ambas especies, aunque en el medio LBM se alcanzaron menores densidades celulares (Figura 8).

Tabla 2. Concentración de AHLs (nM) a lo largo de la curva de crecimiento de sobrenadantes extraídos de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 en cultivos estáticos de LB, LBM, LB tamponado con el buffer PIPES (LB pH) y medio MMA durante 48 h.

<i>A. nosocomialis</i> M2																
<i>A. baumannii</i> ATCC17978																
Time (h)	Medio LB				Medio LBM				Medio LB pH controlado				Medio MMA			
	OHC10	OC12	OHC12	OHC14	OHC10	OC12	OHC12	OHC14	OHC10	OC12	OHC12	OHC14	OHC10	OC12	OHC12	OHC14
6	-	-	-	0,156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,200	-	21,716	0,099	0,591	-	-	0,162	-	-	-	-	0,202	0,265	0,084	-
17	2,119	-	102,675	0,327	23,170	-	-	1,098	-	-	-	-	0,928	-	27,144	-
24	3,687	0,041	89,903	0,109	95,218	-	-	0,620	-	-	-	-	1,180	0,063	57,550	-
36	0,219	-	3,189	0,060	38,131	-	-	0,061	-	-	-	-	-	0,028	0	-
48	-	-	0,501	0,100	0	-	-	0,008	-	-	-	-	-	0,095	0	-
6	0,041	-	0,591	-	0,591	-	-	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,289	-	23,170	-	23,170	-	-	1,098	-	-	-	-	0,162	-	20,551	-
17	1,659	-	95,218	-	95,218	-	-	0,620	-	-	-	-	1,098	-	90,089	-
24	2,078	-	38,131	-	38,131	-	-	0,061	-	-	-	-	0,620	-	28,418	-
36	0,060	-	0	-	0	-	-	0,061	-	-	-	-	0,061	-	0,167	-
48	-	-	0	-	0	-	-	0,008	-	-	-	-	0,008	-	0	-
6	-	-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	1,503	-	1,503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,184	-
17	0,411	-	47,393	-	47,393	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,845	-
24	6,575	0,061	215,634	-	215,634	-	-	0,061	-	-	-	-	0,061	-	2,406	-
36	11,753	0,0368	130,099	-	130,099	-	-	0,232	-	-	-	-	0,232	-	10,567	-
48	8,391	-	20,612	-	20,612	-	-	0,101	-	-	-	-	0,101	-	0	-
17	0,052	-	0,046	-	0,046	0,008	-	0,053	-	-	-	-	0,053	-	0,413	0,006

-: ausencia de AHL

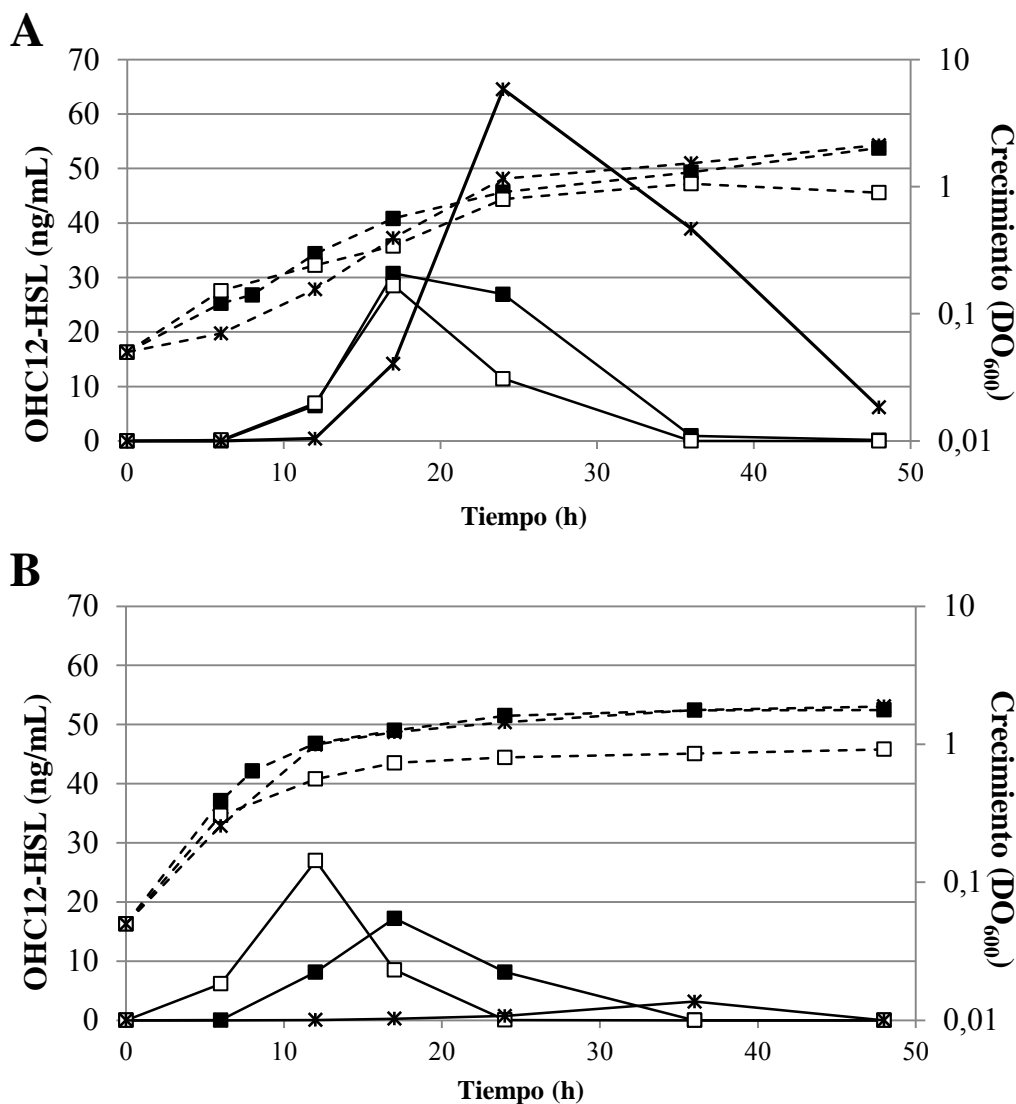


Figura 8. Cinéticas de producción de OHC12-HSL (líneas continuas) y curvas de crecimiento (líneas discontinuas) en cultivos estáticos de A) *A. baumannii* ATCC17978 y B) *A. nosocomialis* M2, en LB (cuadrados negros), LBM (cuadrados blancos) y LB con pH controlado con tampón PIPES manteniéndolo por debajo de pH 6,5 (cruces). Las AHLs se identificaron y cuantificaron mediante HPLC-MS.

A pesar de la alta concentración de OHC12-HSL detectada en los sobrenadantes de ATCC17978 en LB comparado con M2, el patrón de producción de AHL fue muy similar en ambas especies. En *A. baumannii* ATCC17978 se alcanzó una concentración máxima a las 17 h de cultivo de alrededor 30 ng/mL (102,675 nM), similar en LB y LBM. A partir de este punto de la curva de crecimiento, la producción de la señal comienza a descender hasta ser indetectable a partir de las 36 h (Figura 8A). El control del pH en el medio mediante la adición del tampón PIPES para evitar la degradación espontánea de las señales de QS, permitió alcanzar mayores concentraciones de OHC12-HSL, detectándose más de 60 ng/mL en los sobrenadantes (215,634 nM) a las 24 h. Sin embargo, el medio tamponado no logró evitar la desaparición de la señal con el tiempo, indicando la posible existencia de actividad enzimática de degradación específica de las señales de QS. En cuanto a *A. nosocomialis* M2, la producción de OHC12-HSL fue ligeramente menor en el medio de cultivo LB (Figura 8B). Además, la cinética de producción en el medio LBM fue también más rápida alcanzando el pico máximo de la señal a las 12 h en comparación con el LB en el cual no se alcanzó hasta

las 17 h. Al igual que en *A. baumannii*, se produjo una caída importante de la producción de la señal en M2 disminuyendo rápidamente hasta ser indetectable tras las 24-36 h de cultivo. Sorprendentemente y a diferencia de lo observado en ATCC17978, el control del pH del medio de cultivo manteniéndolo por debajo de 6,5 no evitó la caída de las AHLs (Figura 8), sugiriendo una posible y mayor degradación de AHLs en esta especie. No se observaron diferencias en las curvas de densidad de cultivo en medio LB y en medio LB tamponado para ambas especies, aunque en el medio LBM se alcanzaron menores densidades celulares (Figura 8).

Asimismo, como se muestra en la figura 9, en las curvas de pH no se encontraron diferencias significativas entre los distintos medios para *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2, excepto en el caso del medio tamponado con el buffer PIPES en el cual la curva de pH se mantuvo para ambas especies alrededor de 6-6,5 pH a lo largo de todo el cultivo, descartando por lo tanto que la desaparición de la señal observada a partir de las 17-24 h sea debida a la subida excesiva del pH del medio y sugiriendo de nuevo una activa degradación de las señales por parte de ambas especies.

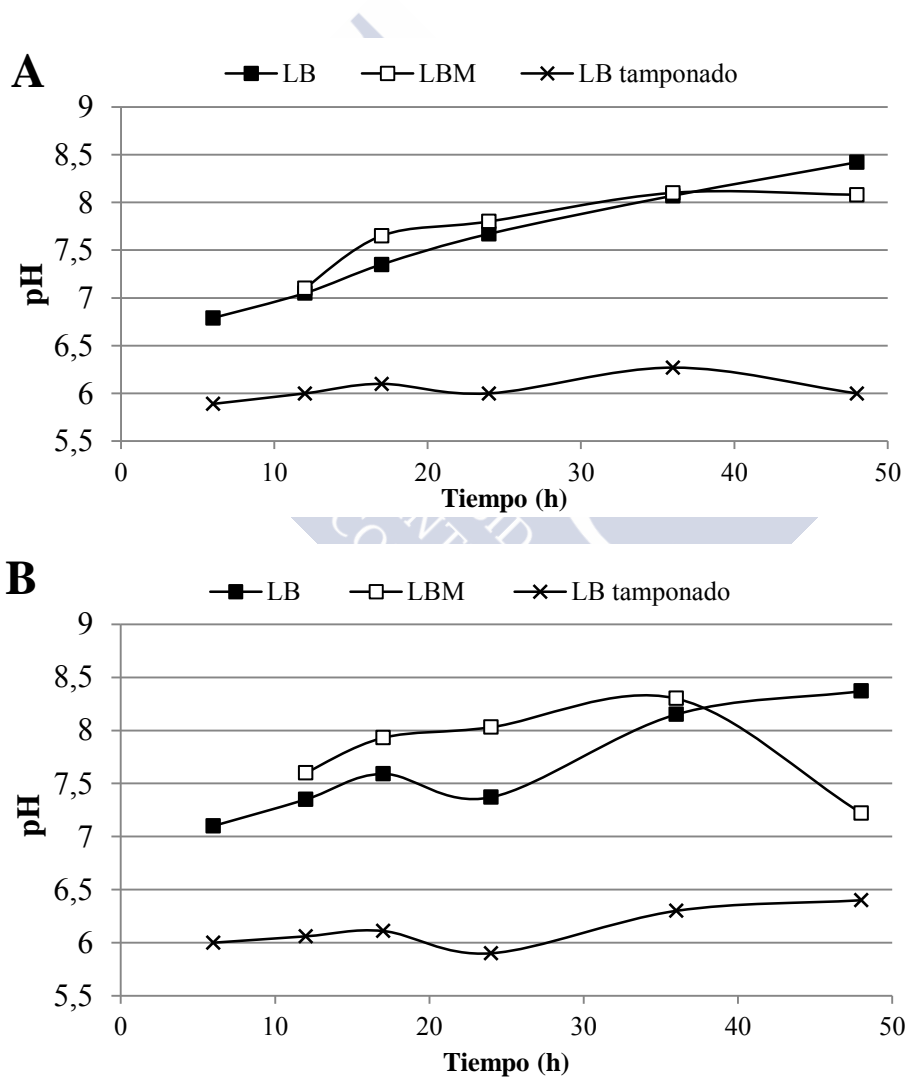


Figura 9. Curvas de pH de los cultivos estáticos de A) *A. baumannii* ATCC17978 y B) *A. nosocomialis* M2, en LB, LBM y en LB con el pH tamponado con PIPES (200 mM, pH 6,0) utilizados para identificar el perfil de AHLs.

A parte de la señal OHC12-HSL, en los sobrenadantes extraídos de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 se detectaron varias AHLs adicionales, aunque a

mucha menor concentración (Tabla 2). Al igual que para OHC12-HSL, la máxima producción se alcanzó entre las 17 y 24 h del cultivo y descendió a continuación (Tabla 2). A las 17 h también se analizó el perfil de AHLs en el medio LB en ambas especies, presentando ATCC17978: C6-HSL (1,582 nM), OC6-HSL (0,182 nM) y C8-HSL (0,773 nM) y M2: C6-HSL (0,347 nM), OC6-HSL (0,114 nM), C8-HSL (1,344 nM), OC8-HSL (0,027) y OHC8-HSL (0,357). En el medio LB se detectaron pequeñas cantidades de OHC10-HSL (3,687 nM o 0,05 ng/mL) en *A. baumannii* ATCC17978 desde las 6 h a las 48 h acompañada de concentraciones menores en orden decreciente de: C6, C8, OHC14, OC6 y OC12-HSL esta última casi indetectable (Tabla 2). En *A. nosocomialis* M2 la segunda señal encontrada fue C8-HSL (1,344 nM) y la máxima concentración de OHC10-HSL fue menor que la encontrada en ATCC17978 (1,180 nM). En esta especie, dos señales adicionales en comparación con ATCC17978, OHC8 y OC8-HSL se identificaron también a bajas concentraciones, además de C6, OC12 y OC6-HSL, mientras que no se encontró OHC14-HSL.

Con respecto al medio de cultivo bajo en nutrientes y sal (LBM), OHC10-HSL fue la única señal adicional identificada por HPLC-MS en ambas especies, aparte de OHC12-HSL contrastando con la gran variedad de AHLs encontrada en el medio de cultivo más rico en nutrientes. Cuando *A. baumannii* ATCC17978 se cultivó en condiciones de pH controlado la producción de OHC10-HSL fue también tres veces mayor que en LB sin el pH tamponado, como se observó para la AHL mayoritaria OHC12-HSL (Figura 8A) y aparecieron cantidades residuales de OC12-HSL. En M2 sin embargo, solo OHC12 y OHC10-HSL aparecieron a muy bajas concentraciones (Tabla 2). En el medio de cultivo mínimo de sales MMA (González et al. 2001) se obtuvo mucha menor concentración de la señal OHC12-HSL (0,046 nM) en *A. baumannii* ATCC17978 en comparación con los medios LB o LBM (Tabla 2), aunque las curvas de crecimiento fueron similares (datos no mostrados).

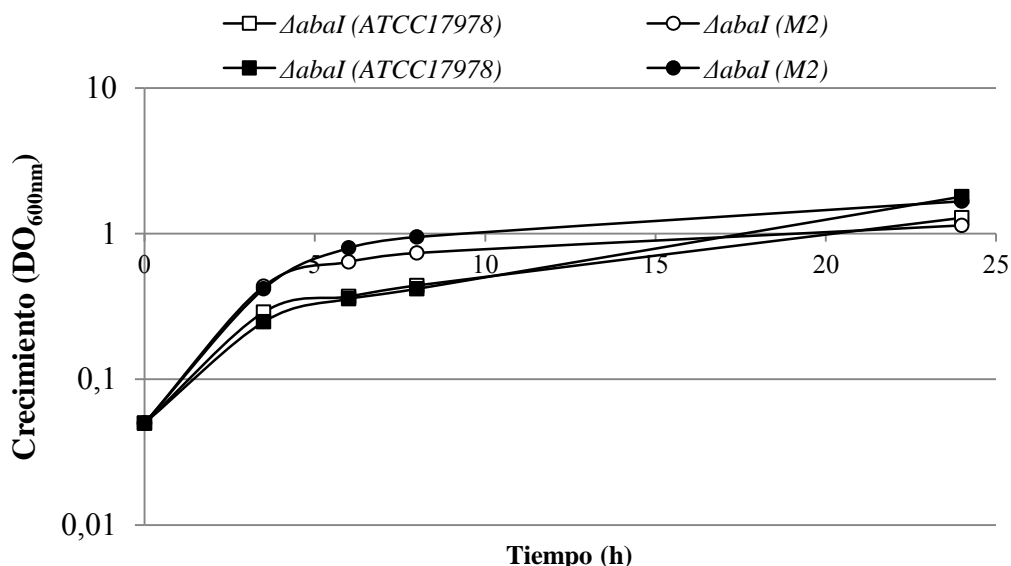


Figura 10. Curvas de crecimiento de los mutantes de las sintasas de AHLs *abaI* de *A. baumannii* ATCC17978 (cuadrados) y *A. nosocomialis* M2 (círculos), en LB (en negro) y LBM (en blanco) en cultivos estáticos durante 24 h.

Por otro lado, no se detectó ninguna producción de AHLs en los mutantes de las sintasas *abaI* correspondientes a ambas cepas en ninguno de los medios probados, a

pesar de que no hubo diferencias de crecimiento entre los mutantes y sus cepas parentales (Figura 10), tanto en cultivos agitados como no agitados (datos no mostrados), indicando que AbaI es la única sintasa presente en ATCC17978 y M2, responsable de la producción de AHLs, o al menos la principal.

1.3. Identificación del perfil de AHLs en cepas clínicas de *Acinetobacter*

Una vez establecido el perfil de AHLs de *A. baumannii* ATCC17978, se procedió al análisis de las señales producidas por varios aislados clínicos de *A. baumannii* y *A. calcoaceticus* disponibles, tomando muestras de los sobrenadantes a las 24 h de cultivo en LB y LBM en condiciones estáticas para extraer, analizar y cuantificar mediante HPLC-MS (Tabla 3). Las distintas cepas hospitalarias a estudiar fueron siete aislados clínicos de *A. baumannii* que proceden de distinto origen (Tabla 1), que presentan distintos patrones de motilidad y resistencia a antibióticos (López et al. 2017) y un aislado de *A. calcoaceticus*. Además también se identificó el perfil de AHLs en el mutante $\Delta adeB$ de la bomba de expulsión de antibióticos AdeABC de *A. baumannii* ATCC17978, para comprobar si esta bomba influía en la producción de señales de QS.

Tabla 3. Cuantificación de las AHLs producidas por los aislados clínicos de *A. baumannii* (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 y Ab7) y por el aislado de *A. calcoaceticus* (AC) a las 24 h de cultivo en LB y LBM en condiciones estáticas mediante HPLC-MS.

Medio LB						
Cepa/aislado clínico	Origen	OHC10	OC12	OHC12	OC14	OHC14
$\Delta adeB$ (ATCC17978)		0,445	-	19,134	-	0,025
Ab1	Aparato respiratorio	-	-	-	-	0,009
Ab2	Úlcera	-	-	-	-	0,027
Ab3	Aparato respiratorio	0,542	0,003	12,475	-	0,012
Ab4	Aparato respiratorio	0,479	-	15,324	-	0,006
Ab5	Aparato respiratorio	-	-	-	-	-
Ab6	Exudado	0,032	-	0,918	-	0,009
Ab7	Sangre	0,016	-	-	-	-
AC	Desconocido	0,382	0,002	11,163	-	-

- : ausencia de AHL

Medio LBM						
Cepa/aislado clínico	Origen	OHC10	OC12	OHC12	OC14	OHC14
$\Delta adeB$ (ATCC17978)		-	-	0,059	0,012	-
Ab1	Aparato respiratorio	-	-	0,092	0,015	-
Ab2	Úlcera	-	-	0,036	0,016	0,019
Ab3	Aparato respiratorio	-	-	0,048	0,017	0,048
Ab4	Aparato respiratorio	-	-	0,074	0,015	0,016
Ab5	Aparato respiratorio	-	-	0,094	0,020	-
Ab6	Exudado	-	-	0,065	0,016	-
Ab7	Sangre	-	0,015	0,036	0,013	0,027
AC	Desconocido	-	-	0,045	0,013	0,017

- : ausencia de AHL

Como se observa en la tabla 3, la mayoría de las cepas presentaron más de una AHL en cultivos en condiciones estáticas en LB y LBM, aunque no se puede atribuir un perfil de AHLs a cada cepa según el lugar del cual fueron aisladas. En general, la señal más abundante en ambos medios fue OHC12-HSL, como se observó en la cinética de producción de AHLs de las especies ATCC17978 y M2 (Figura 8, tabla 2). Mientras que en LB OHC10-HSL es la segunda AHL más abundante en 5 de los aislados, esta señal no se detectó en medio LBM. Al contrario, en medio LBM aparece la señal OC14-HSL, ausente en los cultivos llevados a cabo en LB.

Solo un aislado clínico, la cepa Ab5, no produjo ninguna AHL detectable en este punto de la curva de crecimiento posiblemente por la baja densidad celular alcanzada (Figura 11). Sin embargo, no se puede descartar que produzca alguna AHL en otro punto de la curva de crecimiento o en otras condiciones. En las cepas Ab1 y Ab2, la OHC14-HSL fue la única señal detectada y en la cepa Ab7 solo se consiguió identificar OHC10-HSL.

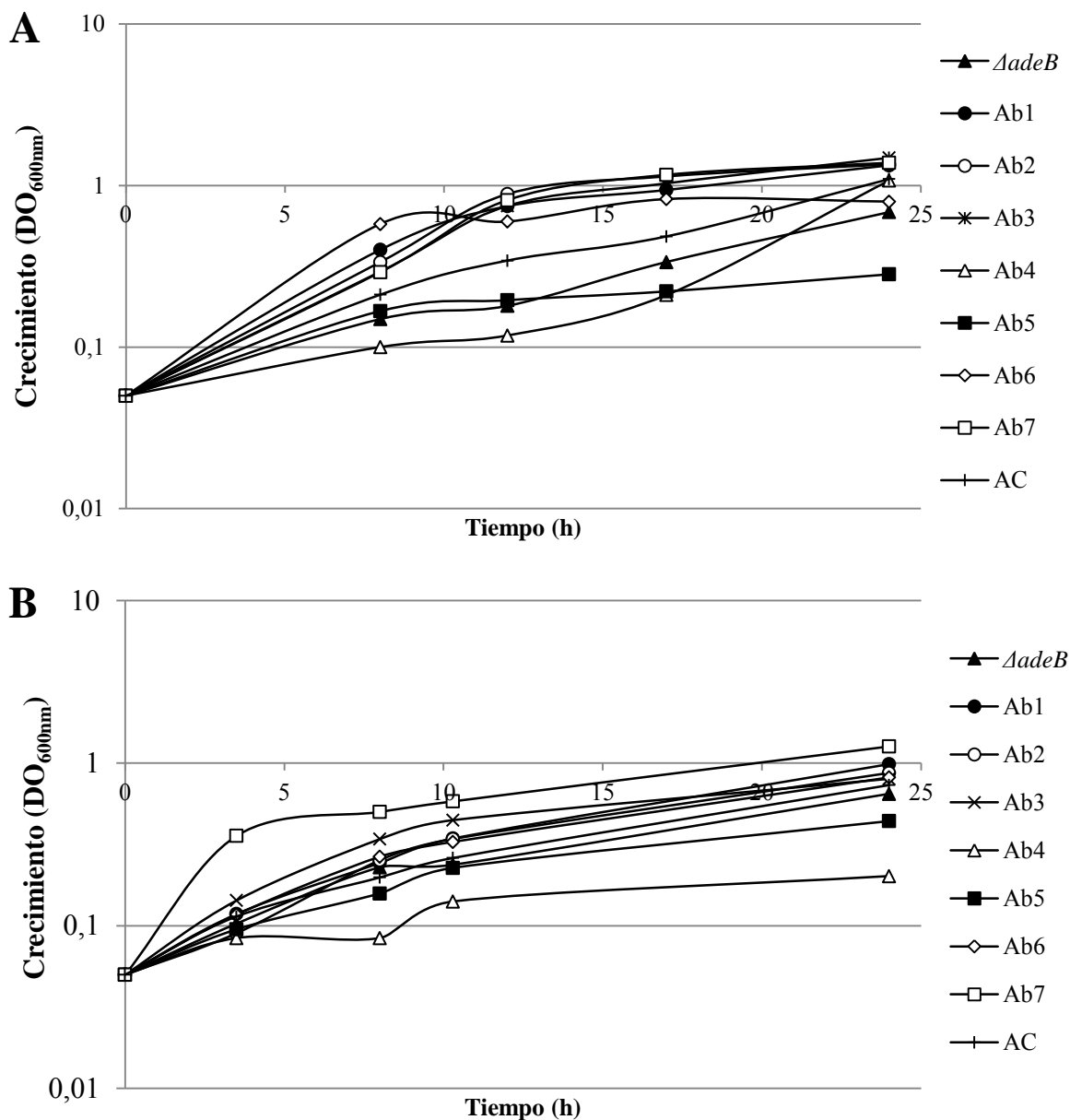


Figura 11. Curvas de crecimiento a 24 h en cultivos estáticos del mutante de la bomba $\Delta adeB$ de ATCC17978 y de los aislados clínicos de *A. baumannii* (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 y Ab7) y el aislado de *A. calcoaceticus* (AC) en A) LB y B) LB modificado.

El mutante $\Delta adeB$ de la bomba de expulsión de antibióticos, presentó un perfil similar de señales de QS que su cepa parental, aunque con menores concentraciones, con OHC12-HSL como señal mayoritaria y con solamente OHC10 y OHC14-HSL como señales adicionales. En el aislado de *A. calcoaceticus* se identificó la OHC12-

HSL como señal mayoritaria además de que presentó otras dos señales adicionales, OHC10 y OC12-HSL (Tabla 3).

En relación al cultivo del medio bajo en nutrientes, se identificó OHC12 y OC14-HSL en todos los aislados clínicos, pero a una concentración mínima, al igual que en el mutante $\Delta adeB$ de la bomba de antibióticos. Algunas de las cepas presentaron alguna señal adicional pero también en cantidades ínfimas (Tabla 3).

1.4. Identificación de genes de QS en el género *Acinetobacter*

Debido a las diferencias encontradas en los perfiles de producción de AHL en las distintas cepas/especies de *Acinetobacter*, se determinó si todas las especies presentaban genes homólogos a la sintasa y el receptor de AHLs *abaI/abaR* y se evaluó la homología entre las secuencias en *Acinetobacter* spp., suponiendo la presencia de una única sintasa de AHLs en cada una de ellas. Mediante PCR y utilizando cebadores internos de los genes de las sintasas de AHLs de *Acinetobacter* (Bitrian et al. 2012) se amplificaron los fragmentos correspondientes de *A. baumannii* ATCC17978, del mutante de la bomba $\Delta adeB$ de ATCC17978, del mutante $\Delta abaI$ de ATCC17978, de *A. nosocomialis* M2, del mutante $\Delta abaI$ de M2, del aislado de *A. calcoaceticus* y de los distintos aislados clínicos de *A. baumannii*. Como resultado de estas PCRs se obtuvieron fragmentos correspondientes a *abaI* para todas las especies y aislados excepto para los mutantes de las sintasas de AHLs de ATCC17978 y M2, como era de esperar, que se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 12).

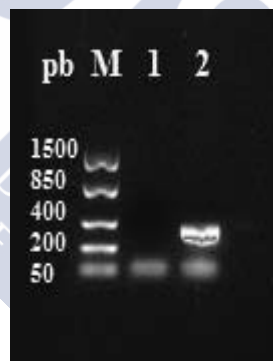


Figura 12. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular (pb). 1: PCR del mutante $\Delta abaI$ de *A. baumannii* ATCC17978 y 2: de *A. baumannii* ATCC17978, con los cebadores internos para amplificar la sintasa de AHLs. El fragmento correspondiente a la sintasa *abaI* (~371 pb) aparece en el tamaño esperado.

En relación con el receptor de AHLs, se obtuvo amplificación en todos los aislados, cepas o especies, que se comprobaron también mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 13).



Figura 13. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular (pb). 1: PCR de *A. baumannii* ATCC17978 con los cebadores internos para amplificar el receptor de AHLs *abaR*. El fragmento que se corresponde con el receptor *abaR* (-615 pb) aparece en el tamaño esperado.

Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados y se estudió la homología entre ellos. Las secuencias internas que amplificamos de *abaI* y *abaR* a partir de *A. baumannii* ATCC17978 comparten un 100% de homología a nivel nucleotídico con las secuencias respectivas depositadas en la base de datos del NCBI. Los fragmentos internos de las sintasas de AHLs amplificados (Figura 14), presentaron una elevada homología a nivel nucleotídico con la secuencia de *abaI* de ATCC17978 (más del 98%), excepto *A. nosocomialis* M2 que solo presentó un 90% de homología.

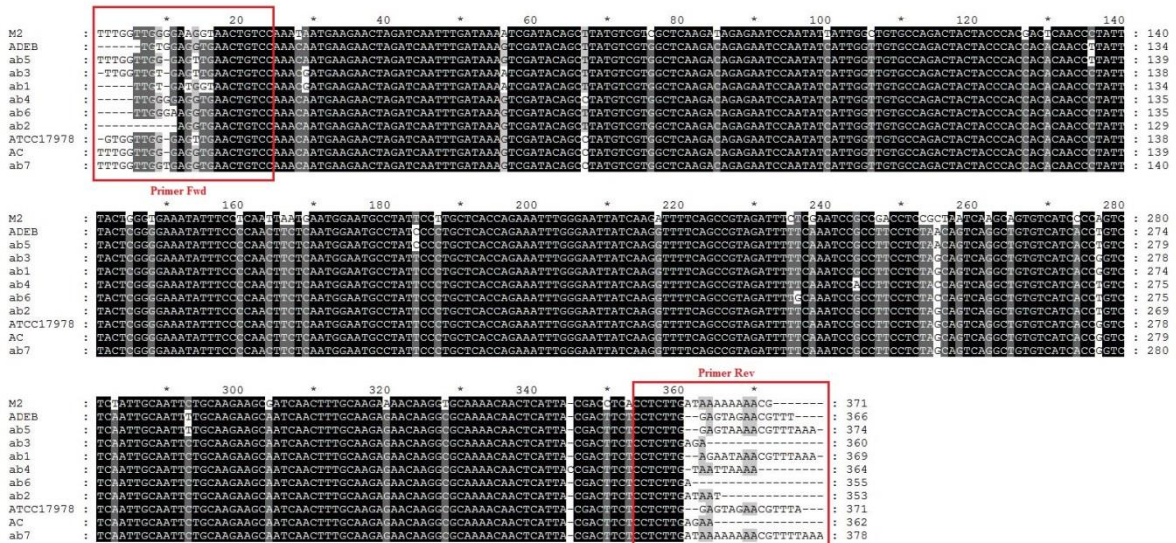


Figura 14. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas internas de las sintasas de AHLs de *A. baumannii* ATCC17978 (ATCC17978), del mutante Δ *adeB* de ATCC17978 (ADEB), de *A. nosocomialis* M2 (M2), del aislado de *A. calcoaceticus* (AC) y de los aislados clínicos de *A. baumannii* (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 y Ab7). Las secuencias se alinearon usando el programa MUSCLE del EMBL-EMBL (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) y se sombreadon con el programa GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Los residuos idénticos (100%), similares (80%) y menos similares (60%) se subrayaron en negro, gris oscuro y gris claro, respectivamente. Los cebadores internos utilizados en la amplificación se encuentran enmarcados en rojo.

En cuanto a los fragmentos internos amplificados correspondientes al receptor de AHLs (Figura 15), el del mutante Δ *abaI* de ATCC17978 presentó un 100% de homología a nivel nucleotídico con el receptor *abaR* de su cepa parental y el del mutante Δ *adeB* de ATCC17978 mostró un 99% de homología a nivel nucleotídico. El fragmento interno de *abaR* de *A. nosocomialis* M2 mostró un 87% con *abaR* de *A.*

1. Motilidad y quorum sensing en *A. baumannii*

baumannii ATCC17978, *A. calcoaceticus* un 87% de homología, y el resto de los aislados clínicos de *A. baumannii* presentaron todos un 99% de homología con la secuencia de ATCC17978.

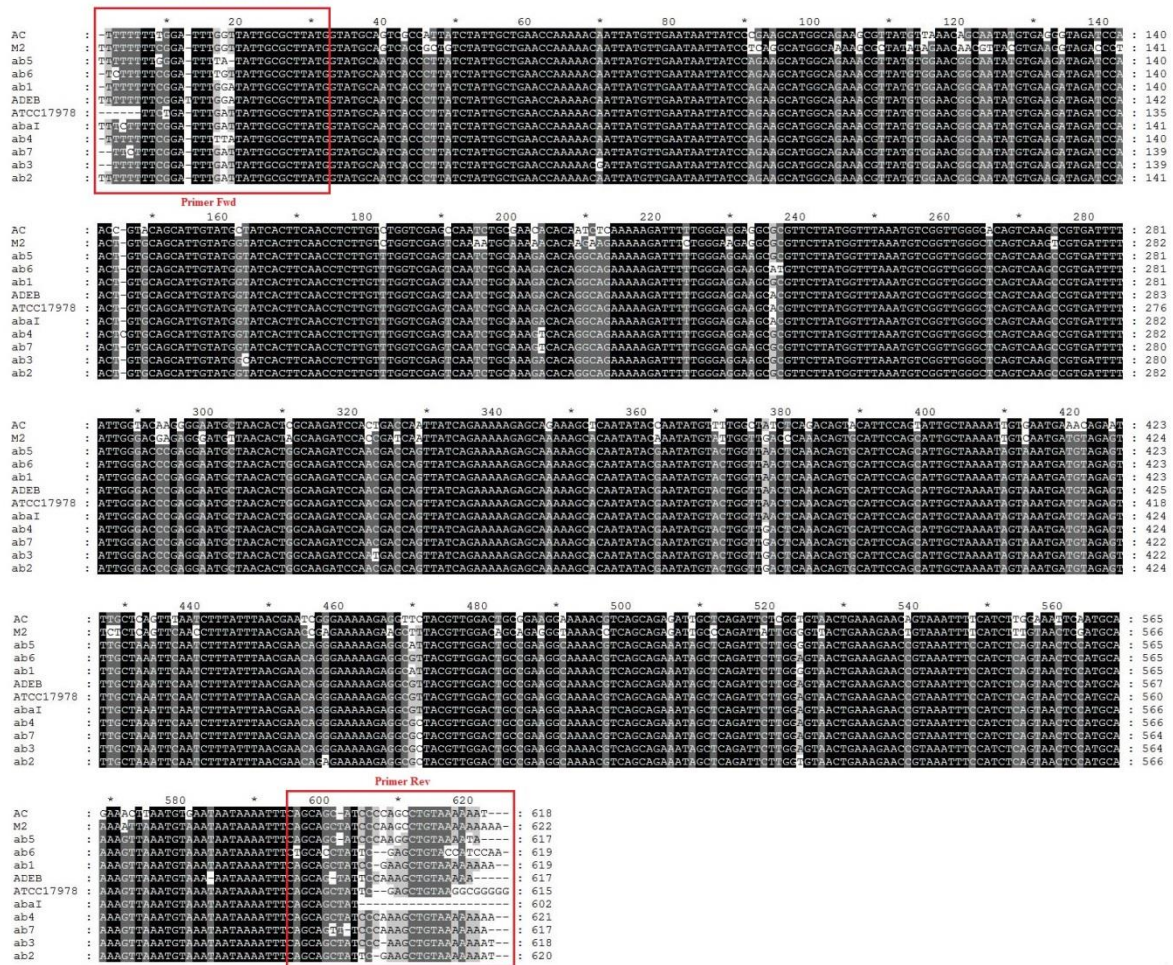


Figura 15. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas internas de los receptores de AHLs de *A. baumannii* ATCC17978, del mutante *Δabal* de ATCC17978 (aba1), del mutante *ΔadeB* de ATCC17978 (ADEB), *A. nosocomialis* M2 (M2), del aislado de *A. calcoaceticus* (AC) y de los aislados clínicos de *A. baumannii* (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 y Ab7). Las secuencias se alinearon usando el programa MUSCLE del EMBL-EMI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) y se sombreado con el programa GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Los residuos idénticos (100%), similares (80%) y menos similares (60%) se subrayaron en negro, gris oscuro y gris claro, respectivamente. Los cebadores internos utilizados en la amplificación se encuentran enmarcados en rojo.

2. Motilidad asociada a superficie en *A. baumannii* y *A. nosocomialis*

2.1. Efecto del tipo de agar y del medio de cultivo

En primer lugar, para evaluar en qué condiciones *Acinetobacter* era capaz de moverse sobre la superficie del medio de cultivo semisólido, se realizó una primera prueba con placas de LB con distintos porcentajes (0,25, 0,3 y 0,35%) de agar Eiken (Harshey y Matsuyama 1994, Clemmer et al. 2011), depositando 1 μL de un cultivo de 17 h de *A. baumannii* ATCC17978 sobre la superficie del medio semisólido. Tras 14 h a 37°C, *A. baumannii* solo fue capaz de iniciar una ligera migración (alrededor de 1 cm de diámetro) sobre la superficie de la placa con 0,25% de agar (Figura 16). A mayores porcentajes de agar *A. baumannii* no fue capaz de moverse (datos no mostrados), por lo que elegimos este porcentaje para el resto de experimentos realizados a lo largo de todo este trabajo.



Figura 16. Ensayo de motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 en placas de LB con 0,25 % agar Eiken.

A continuación, evaluamos el efecto del medio (LB o LBM) y tipo de agar (Difco o Eiken) sobre la motilidad asociada en superficie de *A. baumannii* ATCC17978, ya que resultados previos en la bibliografía indicaban un efecto fuerte de los nutrientes y de la concentración de sal sobre la motilidad de *Acinetobacter* (Barker y Maxted 1975, Eijkelkamp et al. 2011a, Skiebe et al. 2012, McQueary et al. 2012). Además, utilizamos como especie de referencia en las mismas condiciones *A. baumannii* M2, reclasificada recientemente como *A. nosocomialis* M2 (Carruthers et al. 2013), pues la mayoría de la bibliografía relacionada con la motilidad aparece referida a esta especie. Debido a los indicios descritos anteriormente sobre la participación del QS en la motilidad de *Acinetobacter*, decidimos caracterizar del mismo modo los mutantes de las sintasas de AHLs de ambas especies.

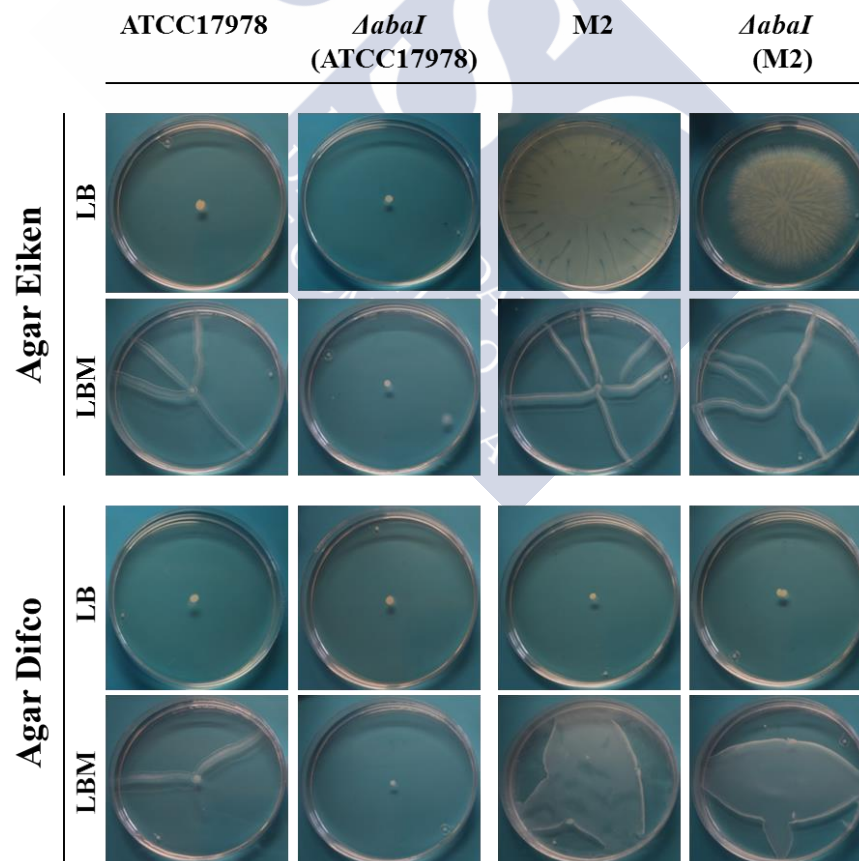


Figura 17. Efecto del medio de cultivo y del tipo de agar sobre la motilidad asociada a superficie. Las células de *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y sus respectivos mutantes de la sintasa *abaI* se inocularon en la superficie de las placas realizadas con LB o LBM y 0,25 % de agar Eiken o Difco. Tras 14 h de incubación a 37°C, se tomaron fotografías de las placas. Cada fotografía es representativa de 3 experimentos independientes.

El medio LB inhibió la motilidad asociada a superficie en *A. baumannii* ATCC17978 en los dos tipos de agar, al contrario que en *A. nosocomialis* M2 en donde solo bloqueó la motilidad en placas de agar Difco pero permitió la migración en placas de agar Eiken, expandiéndose de manera continua desde el punto de inoculación hacia el borde de la placa (Figura 17). El medio bajo en nutrientes y sal (LBM) promovió la motilidad en ambas especies independientemente del tipo de agar usado, demostrando un fuerte efecto de la composición del medio de cultivo sobre la motilidad. Mientras que *A. baumannii* ATCC17978 presentó el mismo patrón de motilidad ramificado en el LBM en los dos tipos de agar, formando tentáculos desde el punto central de inoculación, el patrón de motilidad de *A. nosocomialis* M2, cambió radicalmente dependiendo del tipo de agar. En agar Difco, M2 migró de manera expansiva e irregular desde el punto de inoculación hacia el borde de la placa, mientras que en agar Eiken presentó un fenotipo arborescente, ramificado con brazos o tentáculos, similar al de ATCC17978, pero con mayor número de ramificaciones en el medio LBM y mostró un fenotipo de elevada motilidad expandiéndose de manera continua por toda la placa desde el punto central del inóculo en LB (Figura 17). Cabe destacar la diferente respuesta de los mutantes de la sintasa de AHLs obtenida en los ensayos de motilidad. El mutante Δ *abaI* de ATCC17978 no fue capaz de moverse en ninguna de las condiciones, indicando una influencia del QS en esta especie. Sin embargo, el mutante de *A. nosocomialis* M2 presentó el mismo fenotipo y patrón de motilidad que la cepa parental (Figura 17).

Considerando que a la misma concentración el agar Eiken fue más permisivo que el Difco para la motilidad en ambas especies, decidimos realizar el resto de los ensayos de motilidad asociada a superficie con el agar de tipo Eiken (0,25%).

2.2. Efecto del QQ sobre la motilidad asociada a superficie

Debido a la relación descrita anteriormente en la bibliografía entre el QS mediado por señales de tipo AHLs y la motilidad en *A. nosocomialis* (Clemmer et al. 2011, Oh y Choi 2015), estudiamos cómo afecta la inactivación de las sintasas de AHLs y las estrategias de QQ a la motilidad de ambas especies. De este modo, se evaluó el efecto de la enzima con actividad degradadora de AHLs Aii20J (Mayer et al. 2015) sobre la motilidad en superficie. Aii20J es una lactonasa aislada de la bacteria marina *Tenacibaculum* sp. 20J en trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio (Mayer et al. 2015). Esta enzima ha sido clonada, sobre-expresada en *Escherichia coli* y purificada mediante columnas de purificación de afinidad por histidina. Presenta un amplio espectro de actividad QQ y pertenece a la superfamilia de las metalo- β -lactamasas. Posee una actividad específica mucho mayor que el enzima de referencia de esta superfamilia, AiiA de *Bacillus* spp., manteniendo su actividad a altas temperaturas y siendo resistente a un amplio rango de pH y la acción de las proteasas. Aunque degrada un amplio rango de AHLs (Mayer et al. 2015), debido a que la AHL mayoritaria de *A. baumannii* ATCC17978 es OHC12-HSL, contra la que no se había ensayado previamente la actividad de Aii20J, analizamos específicamente la capacidad de degradación del enzima Aii20J de esta AHL y de otras señales de cadena larga con 3-oxo y 3-hidroxi derivados menos comunes, que aún no se habían probado en trabajos anteriores (Mayer et al. 2015). Para ello, realizamos un bioensayo de inhibición de violaceína en placa para analizar la capacidad de actividad de QQ contra estas AHLs menos usuales (Figura 18).



Figura 18. Degradación de distintas AHLs por la enzima de QQ purificada Aii20J, medida mediante bioensayo en medio sólido con *C. violaceum* VIR07. La enzima, a una concentración final de 20 µg/mL, se incubó durante 24 horas con cada señal a 10 µM, independientemente. El PBS pH 6,7 con cada señal (OC10, OHC10, OC12, OHC12, OC13, OC14, OHC14 y C16-HSL) se utilizó como control negativo.

Como era de esperar la enzima fue capaz de degradar todas las señales que detecta el biosensor *C. violaceum* VIR07, impidiendo que el sensor produzca violaceína en los pocillos donde actúa (Figura 18). Teniendo en cuenta que la señal mayoritaria de *Acinetobacter* spp. es OHC12-HSL (Tablas 2 y 3, figura 8), y el biosensor no detecta claramente la señal a esta concentración (10 µM), adicionalmente se realizó una cinética de degradación de esta señal y sus derivados OC12 y C12-HSL (Figura 19). Esto también explicaría que no se puedan detectar señales con estos biosensores, ya que la concentración máxima alcanzada en cultivos de ATCC17978 fue de dos órdenes de magnitud menores que la concentración que detecta el *C. violaceum*, alrededor de 30 ng/mL (102,6 nM) (Tabla 2).

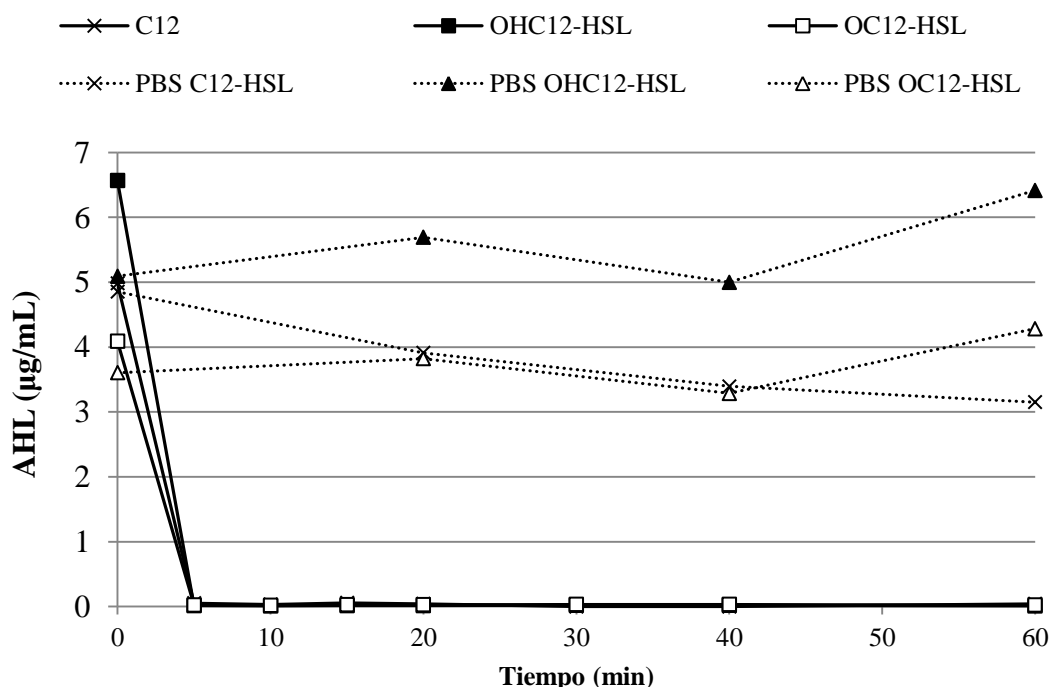


Figura 19. Cinética de degradación a distintos tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 60 min) de C12, OC12 y OHC12-HSL (50 µM) por Aii20J (20 µg/mL) (líneas continuas), mediante HPLC-MS. Como control se evaluó la variación en el tiempo de la concentración de una solución de cada AHL en PBS pH 6,7 (líneas discontinuas).

Como resultado, la enzima fue capaz de degradar completamente las tres señales tras 5 minutos de exposición en comparación con los controles (Figura 19), demostrando su gran potencial para degradar las señales de QS de *Acinetobacter* spp.

Una vez verificada la capacidad de Aii20J para degradar la principal AHL utilizada por el género *Acinetobacter*, se evaluó su efecto sobre la motilidad asociada en superficie de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 en el mismo bioensayo de motilidad en placa en LB y LBM con agar Eiken (0,25%). Como referencia, también añadimos la furanona C-30, un inhibidor de QS mediado por AHLs descrito en el alga roja *Delisea pulchra* que antagoniza estas señales al competir por el sitio de unión al receptor de tipo LuxR (Givskov et al. 1996).

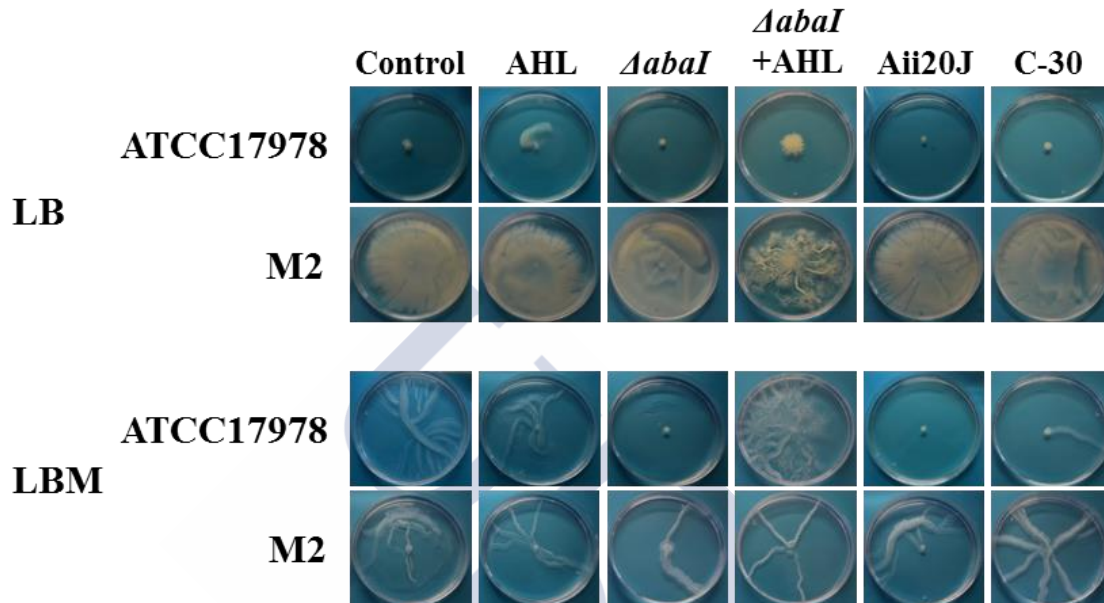


Figura 20. Efecto de la mutación de la sintasa de AHLs ($\Delta abaI$), de la adición de OHC12-HSL (AHL) a 10 μM , de la lactonasa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de la furanona (C-30) (10 μM) sobre la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 en placas de LB o LBM con agar Eiken (0,25%). Las placas se incubaron durante 14 h a 37°C. Las imágenes son representativas del resultado de tres experimentos diferentes.

De nuevo, confirmando los datos anteriores, el medio de cultivo influyó en la motilidad de ambas especies (Figura 20). *A. baumannii* ATCC17978 solo fue capaz de migrar sobre la superficie de la placa en el medio LBM, mientras que *A. nosocomialis* M2 fue capaz de migrar en ambos medios (LB o LBM) presentando diferente fenotipo según el medio como observamos en ensayos anteriores (Figuras 17 y 20). El medio rico en nutrientes promovió una mayor motilidad asociada a superficie en M2, donde presentó el fenotipo de elevada motilidad en comparación con el patrón ramificado en tentáculos observado en el LBM (Figuras 17 y 20). Claramente los resultados mostraron una respuesta diferente a la inactivación del QS según la especie. El mutante $\Delta abaI$ de *A. baumannii* ATCC17978 no es capaz de moverse en ninguna de las condiciones probadas (Figura 20), lo que sugiere que es necesario un sistema de QS activo para la motilidad en superficie de esta especie, al menos en las condiciones utilizadas en este trabajo. Además, la adición exógena de OHC12-HSL, la AHL mayoritaria identificada en nuestros cultivos de *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y del resto de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *A. calcoaceticus* y también descrita en la bibliografía (Niu et al. 2008, Oh y Choi 2015) (Tablas 2 y 3), consiguió restaurar el fenotipo motil en el mutante de ATCC17978 (Figura 20). La adición de la lactonasa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), inhibió por completo la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978, en contraste con la furanona C-30 (Figura 20), indicando un mayor potencial en el uso de estrategias de QQ basadas en la degradación enzimática de las señales en comparación

con inhibidores para este fenotipo. De nuevo, en el caso de *A. nosocomialis* M2, el mutante $\Delta abaI$ fue capaz de migrar del mismo modo que la cepa parental en ambos medios de cultivo (Figura 20). Además, tanto la adición de la lactonasa Aii20J como la adición de la AHL no mostraron ningún efecto sobre la motilidad de esta especie (Figura 20), sugiriendo que el QS no regula la expresión de los genes relacionados con la motilidad en esta especie, al menos en las condiciones probadas.

2.3. Efecto de los nutrientes y de la osmolaridad sobre la motilidad asociada a superficie

En vista de que el medio bajo en nutrientes y sal promovía la motilidad en *A. baumannii* ATCC17978 y modificaba el patrón de la misma en *A. nosocomialis* M2, se decidió evaluar qué componente del medio de cultivo era el responsable de los cambios del fenotipo motil. Se realizó un nuevo ensayo de motilidad asociada a superficie con ambas especies de *Acinetobacter* reduciendo la concentración de cada componente independientemente hasta la concentración final en el LBM (0,5% NaCl, 0,2% triptona y 0,1% de extracto de levadura). Del mismo modo se analizó la respuesta de los mutantes de las sintasas de AHLs para observar cómo afectaba cada nutriente a los mismos, además del efecto de la adición de la lactonasa Aii20J.

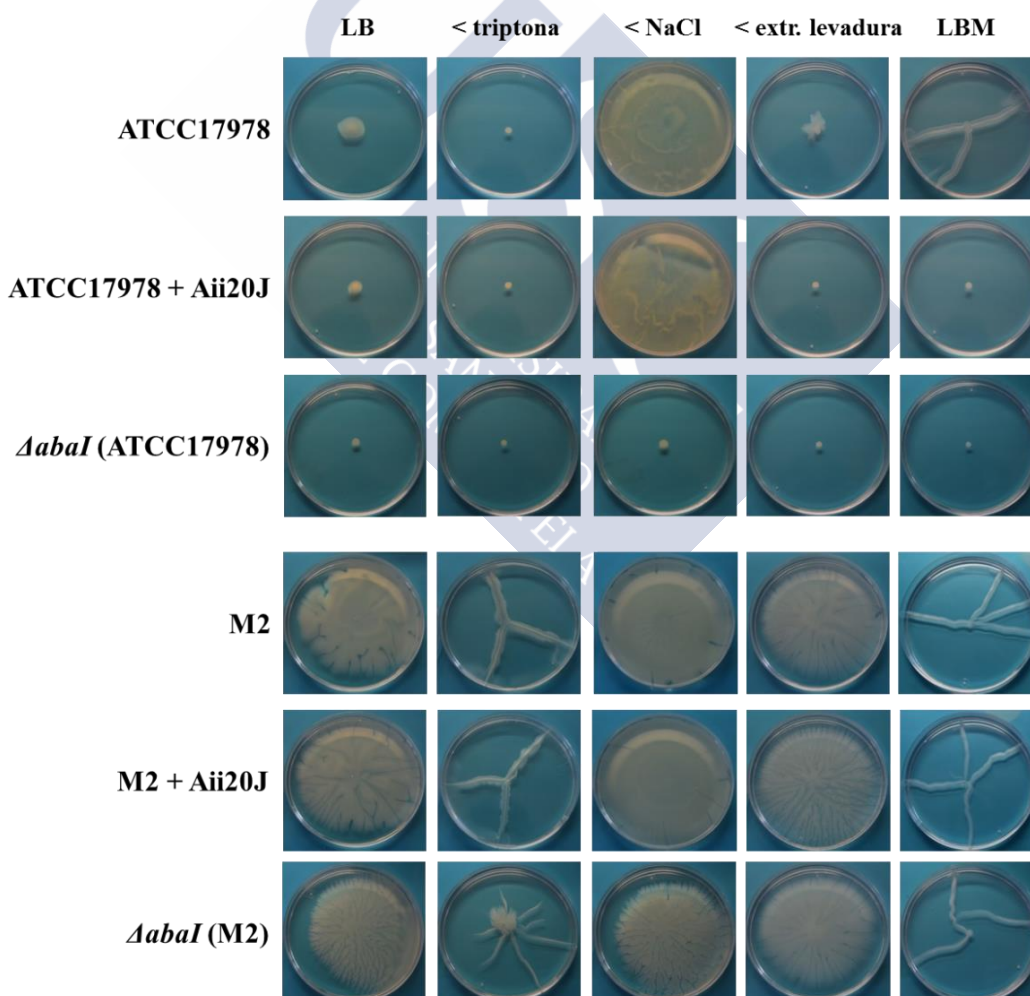


Figura 21. Efecto de los componentes del medio de cultivo sobre la motilidad asociada a superficie. Las células de *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y sus respectivos mutantes de la sintasa *abaI* se inocularon en la superficie de las placas realizadas con LB, LBM o LB con la concentración reducida de cada componente independientemente y 0,25% de agar Eiken. Tras 14 h de incubación a 37°C, se tomaron fotografías de las placas. Cada fotografía es representativa de 3 experimentos independientes.

Los resultados mostraron que en *A. baumannii* ATCC17978 la disminución de la concentración de la triptona, nutriente principal del LB, manteniendo las concentraciones del resto de los constituyentes del LB, produjo una inhibición de la motilidad asociada a superficie, mientras que la reducción en la concentración de sal desde 1% a 0,5% (<NaCl), promueve un fenotipo de elevada motilidad en *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 21), similar al observado en M2 en el medio LB. La reducción del extracto de levadura no provocó cambios importantes. Sin embargo, la combinación de reducir la sal a la vez que el resto de los nutrientes (principalmente la triptona) produce el característico fenotipo ramificado en forma de tentáculos en *A. baumannii* ATCC17978. De nuevo, el mutante *ΔabaI* permaneció inmóvil en todas las condiciones probadas, reafirmando el papel del QS en la motilidad de esta especie. La enzima de QQ Aii20J fue capaz de inhibir la motilidad en todos los casos, salvo cuando solo se disminuye la concentración de sal, en donde la enzima a la concentración añadida no es capaz de restar el efecto de gran motilidad (Figura 21). Hay que salientarlo, que en esta metodología la enzima se añade al inóculo y no está presente en toda la placa, lo que podría explicar la falta de efectividad de Aii20J en el bloqueo de la motilidad en esta condición. En cuanto a *A. nosocomialis* M2, la reducción de la triptona (de 1% a 0,2%) produjo cambios en la motilidad resultando en un fenotipo similar al observado en LBM, indicando que este componente del medio es el responsable del cambio de fenotipo de motilidad en esta especie (Figura 21). Aunque el efecto de la sal aumenta ligeramente la motilidad en M2, podría estar subestimado debido a que en *A. nosocomialis* M2 ya se extiende recubriendo toda la superficie de la placa. El mutante *ΔabaI* de *A. nosocomialis* M2 volvió a presentar el mismo patrón de motilidad que la cepa parental y no se observó ningún efecto de la enzima Aii20J sobre esta especie.

Para evaluar si el efecto de la salinidad sobre la motilidad asociada a superficie fue debido a cambios en la fuerza iónica del medio de cultivo o a la osmolaridad del mismo, se realizó otro ensayo con ambas especies en placas de LB sustituyendo la sal (0,1-0,4M) por el osmolito sacarosa (5-20%).

Tabla 4. Osmolaridades correspondientes a las distintas concentraciones de NaCl y sacarosa utilizadas en el ensayo de motilidad asociada a superficie en placa.

NaCl	Osmolaridad (Osm)	Sacarosa	Osmolaridad (Osm)	LBM	LB
0,1 M	0,2	5%	0,14	0,17 Osm	0,34 Osm
0,2 M	0,4	10%	0,29		
0,3 M	0,6	15%	0,438		
0,4 M	0,8	20%	0,584		

Como se muestra en la figura 22 y tabla 4, las concentraciones iguales o superiores a 10% de sacarosa inhibieron la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978. Estos resultados indican claramente que la osmolaridad y no simplemente la fuerza iónica del medio de cultivo, reduce la motilidad en esta especie. En *A. nosocomialis* se observó también un efecto de la sal, pero el efecto de la osmolaridad fue mayor reduciendo su motilidad desde concentraciones de 5% de sacarosa.

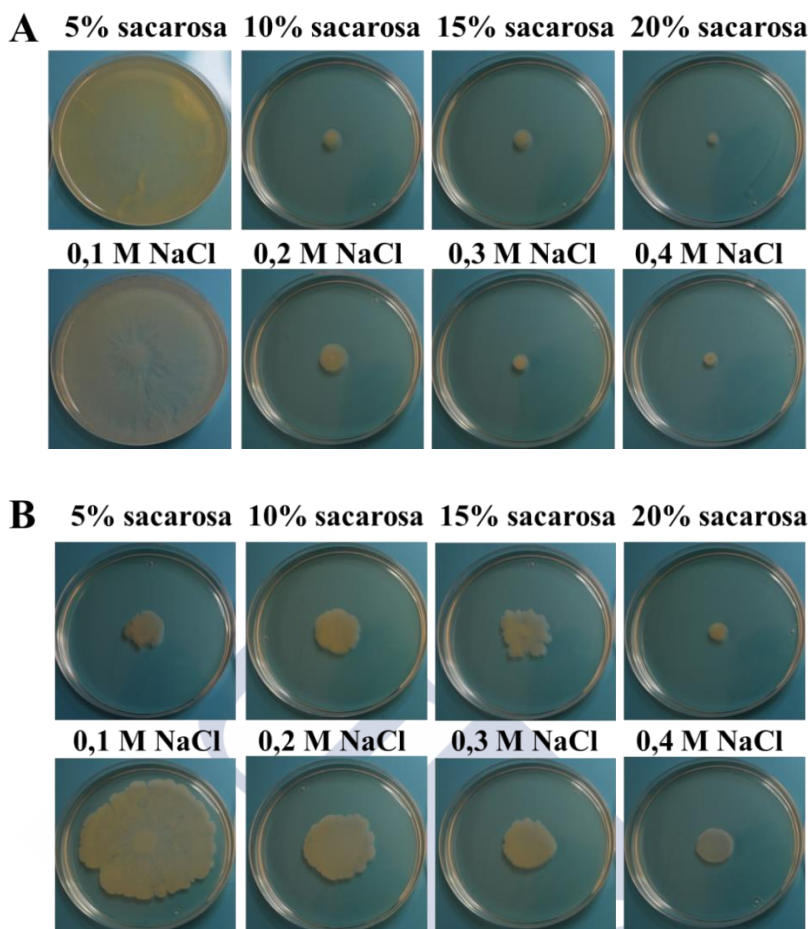


Figura 22. Efecto de la osmolaridad sobre la motilidad asociada a superficie de **A)** *A. baumannii* ATCC17978 y **B)** *A. nosocomialis* M2. Las células de *Acinetobacter* spp. se inocularon en placas de LB con NaCl (0.1-0.4M) o sacarosa (5-20%). Las placas se incubaron a 37°C durante 14 horas. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

2.4. Efecto de la temperatura sobre la motilidad asociada a superficie

En publicaciones anteriores se había constatado la alteración de la motilidad asociada a superficie del mutante de la sintasa de AHLs en *A. nosocomialis* M2 y la posterior recuperación de la motilidad con la adición de OHC12-HSL (Clemmer et al. 2011), contrastando con los resultados descritos en el apartado 2.2 (Figura 20) en los cuales el mutante de la sintasa de M2 presentó el mismo fenotipo de motilidad que la cepa parental. Con la hipótesis de que probablemente estas discrepancias se debieran a las diferentes temperaturas usadas en ambos ensayos, realizamos un ensayo de motilidad asociada a superficie de *A. nosocomialis* M2 y del mutante de la sintasa en LB, LB con la concentración de sal reducida y LBM, a diferentes temperaturas (25, 30 y 37°C) para evaluar si había algún efecto de la misma.

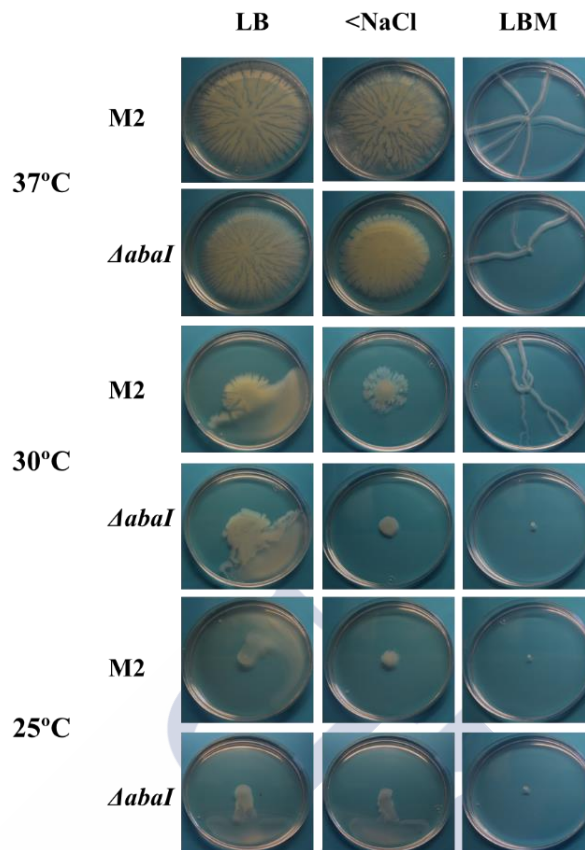


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la motilidad asociada a superficie de *A. nosocomialis* M2 y el mutante de la sintasa $\Delta abaI$ de M2. Las células se inocularon en placas de LB, LB con menor concentración de sal (0,5%) (<NaCl) y LBM. Las placas se fotografiaron tras 14 horas incubadas a diferentes temperaturas (25, 30 o 37°C). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente.

La motilidad de *A. nosocomialis* va mermando a medida que se reduce la temperatura (Figura 23). Como se observa en la figura, a 37°C, temperatura a la cual se realizaron los ensayos de motilidad asociada a superficie en este trabajo, el mutante no presenta grandes diferencias en cuanto a motilidad en los medios LB y LBM en comparación con la cepa parental. Sin embargo, a 30°C se observó un efecto de bloqueo de la motilidad en $\Delta abaI$ al restringir la concentración de sal en el medio (<NaCl), condiciones utilizadas por Clemmer et al. (2011), y en el medio LBM (Figura 23), lo que explica las discrepancias entre nuestros resultados realizados a mayor temperatura y los de la bibliografía. A temperaturas aún menores (25°C), tanto *A. nosocomialis* M2 como el mutante de la sintasa, presentaron una mayor reducción de la motilidad, especialmente en baja sal y en LBM. En cualquier caso, el efecto de la mutación observado a 30°C puede ser considerado menor en comparación con el bloqueo de la motilidad observado para el mutante $\Delta abaI$ de ATCC17978.

2.5. Efecto de la luz azul y de la temperatura sobre la motilidad asociada a superficie

En vista de que existe una influencia negativa de la luz azul sobre la regulación de la motilidad en el complejo ACB, incluyendo a ATCC17978, documentada en la bibliografía a través del receptor de luz *blsA* (Mussi et al. 2010, Bitrian et al. 2012, Golic et al. 2013) y que observamos que la temperatura también puede afectar al patrón de motilidad en *Acinetobacter* (Figura 23), decidimos evaluar el efecto combinado de la

luz azul y la temperatura sobre la motilidad asociada a superficie tanto de *A. baumannii* ATCC17978 como de *A. nosocomialis* M2. Para ello realizamos un ensayo en placa en LB o LBM, incubando las placas a 25 o 37°C en luz azul o en oscuridad. En estas condiciones, también añadimos la lactonasa de QQ Aii20J y la furanona C-30 como referencia de un inhibidor de QS.

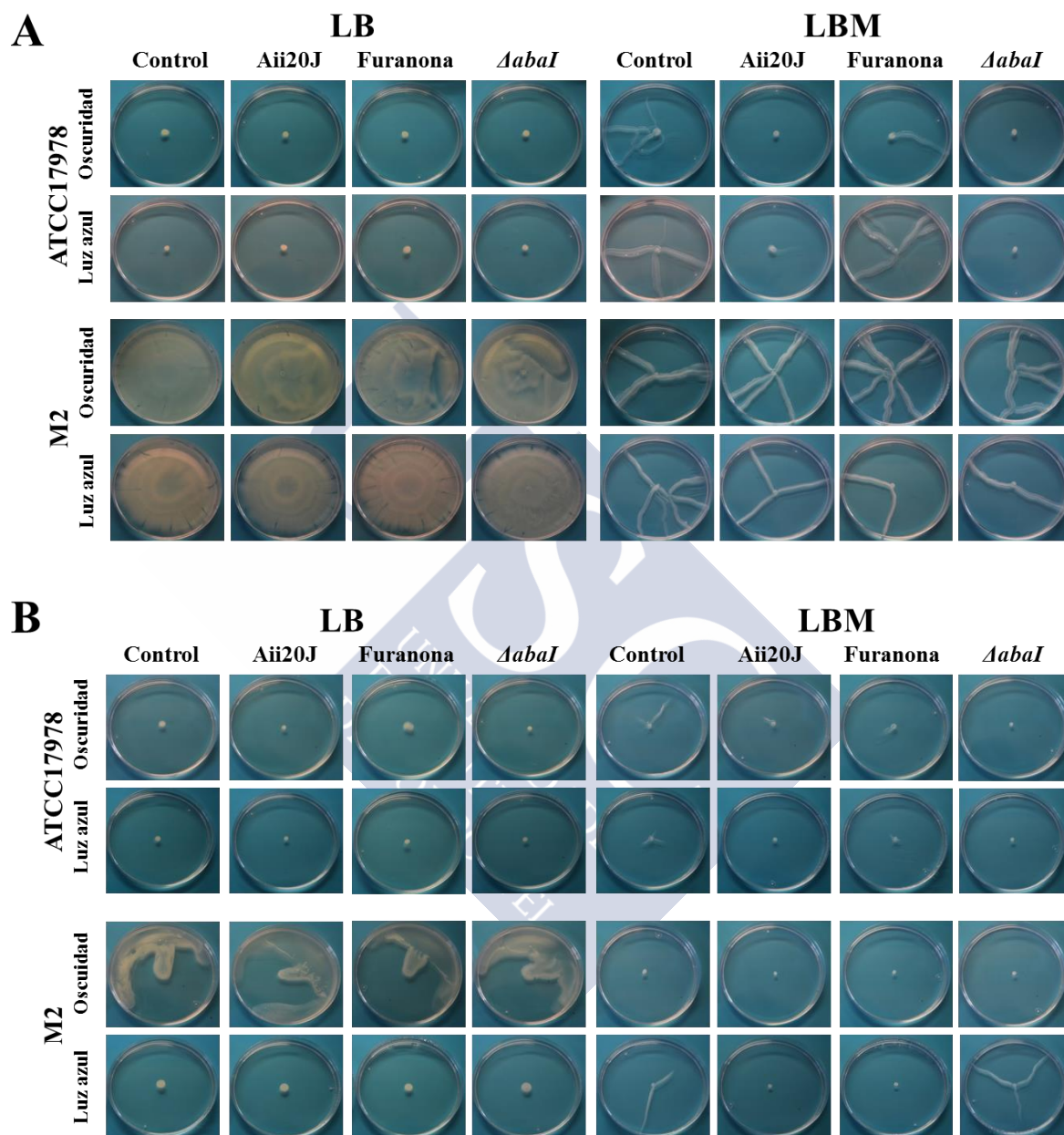


Figura 24. Efecto de la luz azul **A)** a 37°C y **B)** a 25°C, sobre la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y de los mutantes de la sintasa *abaI* de ambas especies, en placas de LB o LBM con agar Eiken (0,25%). La enzima Aii20J o la furanona se añadieron a las concentraciones finales de 20 µg/mL y 10 µM, respectivamente. Cada fotografía es representativa de 3 experimentos realizados consecutivamente.

La luz azul no produjo ningún efecto sobre el fenotipo de la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 a ninguna temperatura ni en ninguna condición probada (Figura 24), siendo capaz de migrar solo en condiciones de nutrientes limitados y respondiendo a la actividad QQ de la lactonasa Aii20J. La furanona no fue capaz de eliminar la

motilidad en esta especie y el mutante *ΔabaI* permaneció inmóvil en todas las condiciones como se observó en los ensayos previos de motilidad. La disminución de la temperatura hasta los 25°C, también afectó a la motilidad de ATCC17978 reduciéndola por completo tanto en oscuridad como en luz azul.

En el caso de *A. nosocomialis* M2, la luz azul inhibió la motilidad asociada a superficie a 25°C en contraste con las placas incubadas a 37°C donde no se observó efecto alguno (Figura 24). A 25°C, la especie M2 presentó una reducción significativa de la motilidad en LB y una inhibición total en el LBM en oscuridad (Figura 24), coincidiendo con los resultados anteriores del efecto de la temperatura (Figura 23). De forma interesante, M2 respondió a la actividad QQ de la enzima Aii20J solo en las placas de LBM incubadas a 25°C en luz azul, en las cuales la cepa parental y el mutante lograron migrar levemente siguiendo el patrón ramificado (Figura 24).

2.6. Efecto de la virstatina sobre la motilidad asociada a superficie

Para evaluar si la motilidad asociada a superficie en *A. baumannii* ATCC17978 es dependiente de pili de tipo IV, se realizó un ensayo en placas de LB, LB con baja concentración de sal (0,5%) y LBM, añadiendo o no virstatina (100 μM), una molécula descrita en la bibliografía como un inhibidor de la motilidad a través de la inhibición de pili de tipo IV (Nait Chabane et al. 2014b). También añadimos la enzima de QQ Aii20J y la enzima junto con la virstatina para observar si se producía algún efecto sinérgico.

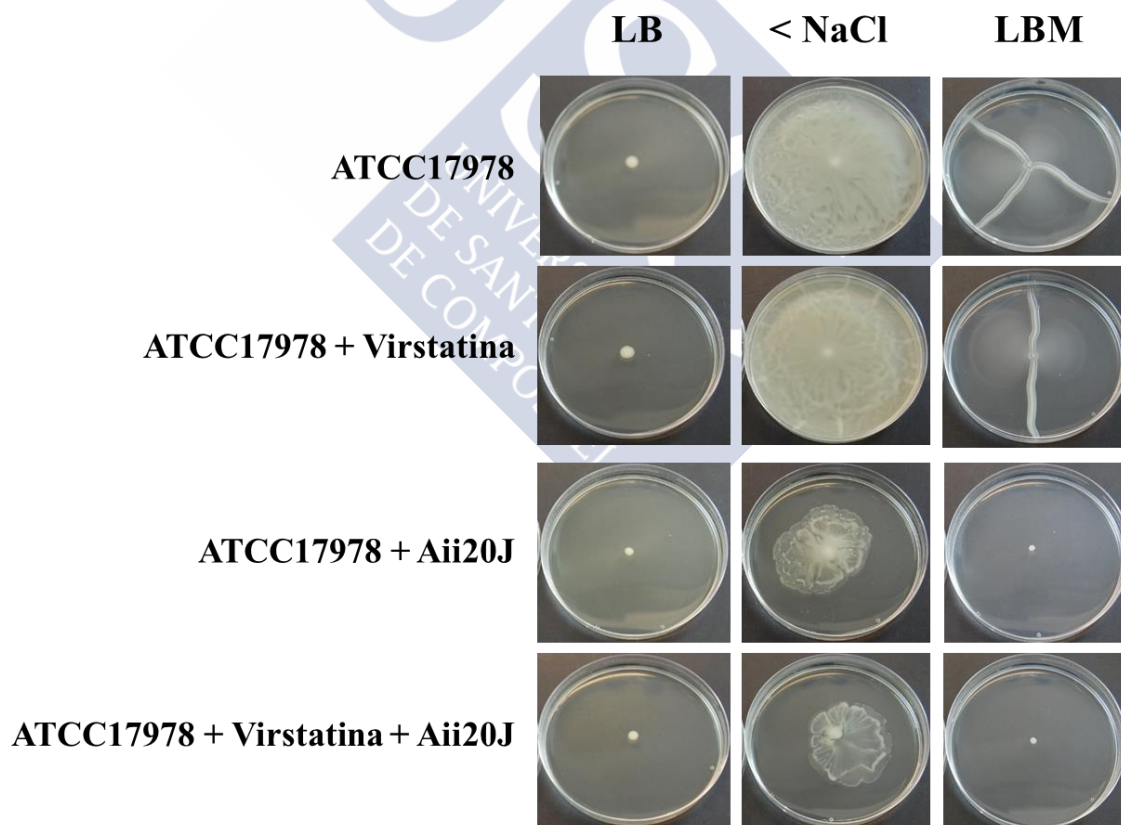


Figura 25. Efecto de la virstatina (100 μM), Aii20J (20 μg/mL) y ambas simultáneamente sobre la motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 en placas de LB, LB con baja concentración de sal (<NaCl) o LB modificado (LBM), con 0,25% de agar Eiken. Tras la incubación durante 14 h a 37°C se tomaron fotografías de las placas. Cada imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 25, se repite siempre el distinto patrón de motilidad según el medio de cultivo. En el medio LB, ATCC17978 permanece inmóvil, sin

embargo, al reducir solamente la concentración de sal se desencadena el fenotipo de elevada motilidad mientras que en LBM aparece el patrón ramificado. La virstatina no fue capaz de inhibir la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978 en ninguno de los dos medios permisivos a diferencia de la enzima de QQ. Como en experimentos anteriores, la enzima de QQ Aii20J bloqueó la motilidad en LBM y en este caso, se observó también una ligera disminución de la motilidad en LB con baja sal. No se observó efecto sinérgico entre ambos inhibidores (Figura 25).

Adicionalmente, para evaluar el posible efecto del medio de cultivo sobre la producción de AHLs en relación a las claras diferencias obtenidas en la motilidad en el medio LB con baja sal (0,5%), decidimos extraer del mismo modo las señales para *A. baumannii* ATCC17978 en este medio de cultivo en agitación y sin agitación (Figura 26). De forma paralela, dada la relación descrita entre la producción de pili y la motilidad en el género *Acinetobacter* (Clemmer et al. 2011, Harding et al. 2013) que contrasta con nuestros resultados (Figura 26), y con la hipótesis de que la producción de pili y la producción de AHLs pudiera estar relacionada de alguna manera, analizamos si la adición de la virstatina tenía algún efecto en la producción de señales de QS en *A. baumannii*. Por lo que realizamos una extracción paralela a las 17 h de AHLs añadiendo la virstatina (100 μ M) a los cultivos en agitación y sin agitación.

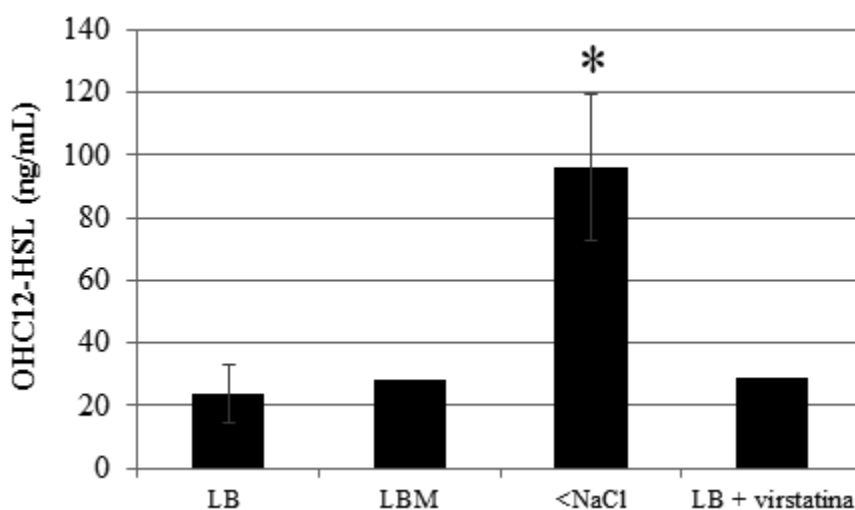


Figura 26. Producción de OHC12-HSL cuantificada mediante HPLC-MS de *A. baumannii* ATCC17978 en LB, LB modificado (LBM), LB con baja sal (0,5%) (<NaCl) y LB con virstatina (100 μ M) a las 17 h de cultivos sin agitación. Los datos significativos ($P < 0,05$, prueba t de Student) se muestran con asteriscos frente al control del cultivo en LB.

De nuevo, comprobamos que *A. baumannii* solo produce señales en condiciones estáticas, apoyando la importancia de las condiciones estáticas para la producción de AHLs en estas especies. Al reducir solamente la sal en el medio de cultivo, se obtuvo un incremento significativamente mayor ($P < 0,05$, prueba t de Student) de la señal mayoritaria OHC12-HSL (Figura 26), sugiriendo una relación positiva entre QS y el incremento de la motilidad asociada a superficie en condiciones de baja concentración de sal. Tras obtener este resultado, realizamos una nueva comprobación del bioensayo de difusión de violaceína para detección de AHLs de *A. baumannii* ATCC17978 con los biosensores de *C. violaceum* pero en placas de LB con baja concentración de sal. Sin embargo, la concentración de AHLs producida en baja sal volvió a ser insuficiente para el biosensor que tiene un límite de detección para la señal mayoritaria OHC12-HSL de 10 μ M, en contraste con los ~ 100 ng/mL (333 nM) que produce ATCC17978.

Además *A. baumannii* ATCC1978 produjo OHC12-HSL sin que la virstatina afectase a la generación de las señales (Figura 26), coincidiendo con nuestros resultados de motilidad en los cuales la virstatina no fue capaz de inhibir la capacidad de migración sobre la superficie de placa de *A. baumannii* ATCC1978 a esta misma concentración (Figura 25).

3. Motilidad asociada a superficie en el mutante $\Delta adeB$ de la bomba AdeABC

Ya que en otras bacterias patógenas como *P. aeruginosa*, se ha demostrado la relación entre estas bombas de eflujo y el QS, que intervienen en la selección específica de la AHL con su receptor de tipo LuxR impidiendo la entrada de otras AHLs (Minagawa et al. 2012), decidimos estudiar la motilidad asociada a superficie del mutante $\Delta adeB$ de *A. baumannii* ATCC1978 en distintas condiciones con el objetivo de evaluar si el QS, los inhibidores de QQ y los distintos nutrientes del medio de cultivo le afectaban del mismo modo que a su cepa parental. Para ello, realizamos el mismo ensayo en placas de LB o LBM con agar Eiken al 0,25% por ser el más permisivo. Además, añadimos la enzima de QQ Aii20J, la furanona C-30 como control y probamos el efecto de la AHL mayoritaria de *A. baumannii* ATCC1978, la OHC12-HSL (Tabla 2).

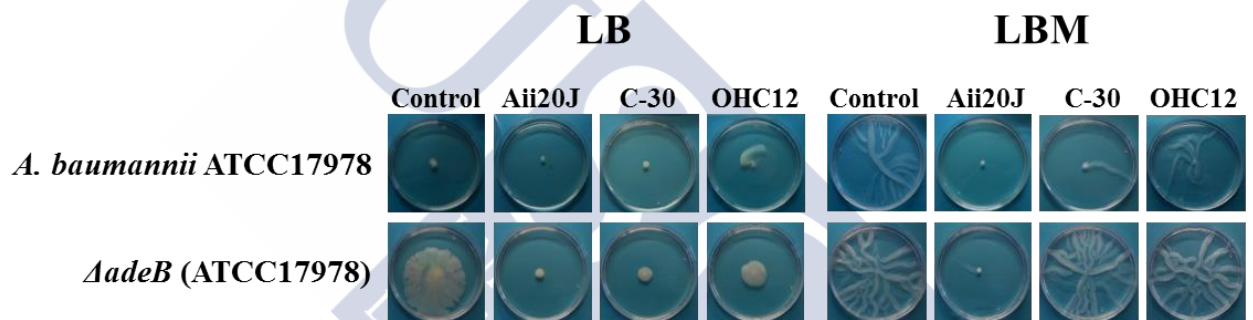


Figura 27. Motilidad asociada a superficie del mutante $\Delta adeB$ de la bomba AdeABC de *A. baumannii* ATCC1978 en comparación con *A. baumannii* ATCC1978, en LB o LBM con agar Eiken (0,25%). Las células se inocularon en el centro de la placa con o sin enzima Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), furanona C-30 (10 μM) o OHC12-HSL (10 μM). Tras 14 h de incubación a 37°C, se tomaron fotografías de las placas que son representativas de tres experimentos consecutivos realizados de manera independiente.

Como muestran los resultados, el mutante de la bomba $\Delta adeB$ presentó mayor capacidad de migración que su cepa parental, ya que produjo motilidad en ambos medios de cultivo (Figura 27), a diferencia de ATCC1978 la cual no fue capaz de migrar en el medio LB en ninguno de los ensayos realizados (Figuras 17, 20, 21, 24, 25 y 26). Además, su patrón de motilidad cambió según la riqueza del medio, en LB avanzando circularmente por la superficie con pequeños entrantes y salientes en el borde de migración y en LB modificado con el característico patrón ramificado de ATCC1978 (Figura 27). Al igual que la cepa parental también respondió a la acción de la lactonasa Aii20J que fue capaz de inhibir por completo su motilidad, al contrario que la furanona que solo fue efectiva en el medio LB y no en el LBM, como ocurre también en la cepa parental (Figura 27). En cuanto a la adición externa de la AHL solo produjo efecto en el medio rico donde inesperadamente disminuyó bastante la capacidad motil del mutante (Figura 27).

Después de observar que la variación de la concentración de sal en el medio de cultivo afectaba en gran medida al fenotipo de motilidad en *A. baumannii*, evaluamos si se producía el mismo efecto en el mutante $\Delta adeB$ de la bomba. De este modo,

analizamos mediante un ensayo en placa la motilidad en LBM y LB con baja sal (0,5%) añadiendo o no la lactonasa de QQ Aii20J.

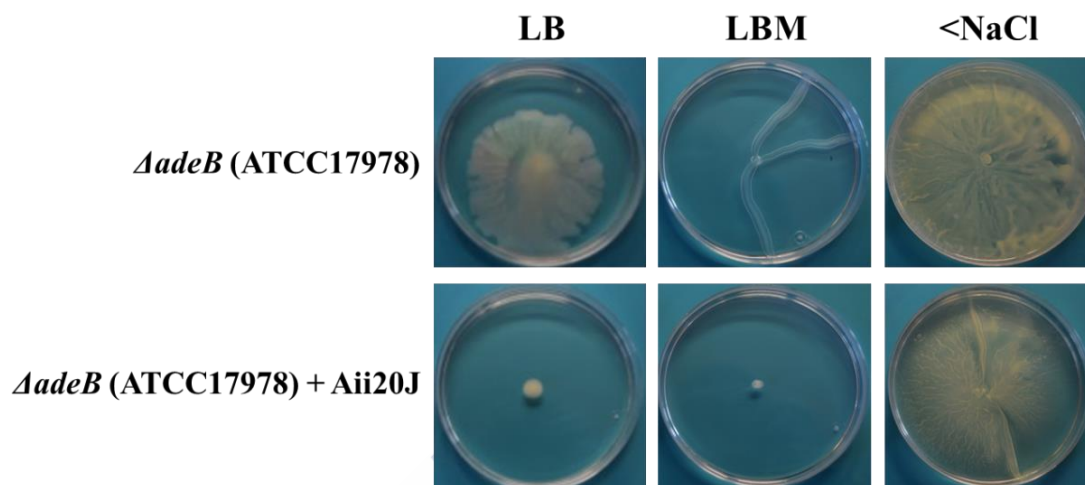


Figura 28. Fotografías de la motilidad asociada a superficie del mutante $\Delta adeB$ de la bomba AdeABC de *A. baumannii* ATCC17978 en LBM y LB con baja concentración de sal (0,5%) (<NaCl) en placas de agar Eiken (0,25%). La enzima Aii20J se añadió a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las imágenes son representativas de tres experimentos distintos realizados de manera independiente.

Como llevamos observando a lo largo de todo este capítulo y como era de esperar, la sal también ejerce un efecto sobre la motilidad asociada a superficie del mutante $\Delta adeB$ de la bomba produciendo un patrón de elevada motilidad (Figura 28), al igual que en su cepa parental ATCC17978 (Figuras 21, 22, 25 y 26). La enzima Aii20J solo es capaz de inhibir la motilidad en condiciones de baja concentración de nutrientes y sal, y no solo disminuyendo la concentración de sal, como ocurre también en la cepa parental.

4. Motilidad asociada a superficie en diversas cepas clínicas de *Acinetobacter*

4.1. Efecto del medio de cultivo, del QS y del QQ

Debido a que la adición de la lactonasa de QQ Aii20J afectaba a la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978 demostrando que el QS mediado por AHLs está involucrado en la misma y con la hipótesis de que variaciones en la producción de AHLs de las distintas especies/aislados pudieran generar las diferencias observadas en la motilidad asociada a superficie, se evaluó si los aislados de *A. baumannii* y *A. calcoaceticus* (Tabla 3), tenían la capacidad de migrar por la superficie de las placas de LB o LBM. Además, para evaluar si la motilidad estaba regulada por el QS, se añadió la lactonasa de QQ Aii20J a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la furanona C-30 como referencia de un inhibidor de QS. Por otra parte, probamos el efecto de añadir exógenamente la AHL mayoritaria, OHC12-HSL.

En general, como ya vimos en *A. baumannii* ATCC17978 y en *A. nosocomialis* M2, el medio de cultivo es un factor importante para la motilidad en este género (Figura 29). Varios aislados mostraron migración sobre placa en LB y observándose un patrón de motilidad diferente según el medio, expandido por la placa en el medio rico en contraste con el ramificado en el medio LBM. Tres aislados clínicos de *A. baumannii* no fueron capaces de migrar en ninguno de los dos medios de cultivo, Ab2, Ab3 y Ab4. La AHL tampoco pudo promover la motilidad en estas cepas (Figura 29). El aislado de *A. calcoaceticus* (AC) mostró un perfil de motilidad similar al mutante de la bomba de eflujo $\Delta adeB$ de ATCC17978 (Figura 27 y 29), siendo capaz de migrar en los dos

medios de cultivo, con un patrón distinto en cada uno, respondiendo a la acción de Aii20J y solo en el medio rico a la acción de la furanona. Sin embargo, en el medio rico en nutrientes el borde de migración fue distinto, en masa compacta, sin entrantes y salientes, como produjo *ΔadeB*. La OHC12-HSL añadida no causó ningún efecto significativo en el aislado de *A. calcoaceticus*, salvo en el medio bajo en nutrientes y yal donde se formaron más ramificaciones con ambas señales.

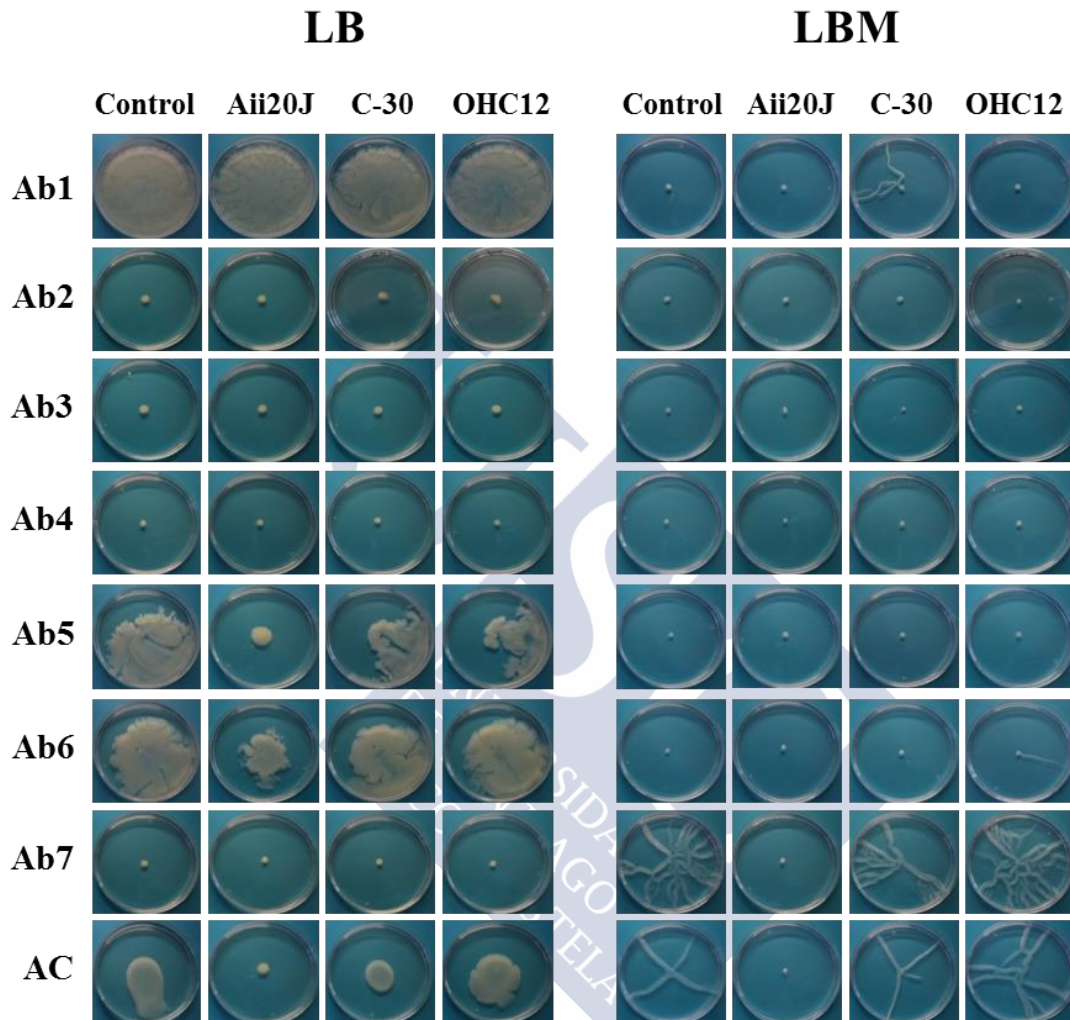


Figura 29. Efecto de la lactonasa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de la furanona (C-30) (10 μM) y de la adición exógena de OHC10 y OHC12-HSL a 10 μM sobre la motilidad asociada a superficie en LB y LBM con 0,25% de agar Eiken, de los aislados clínicos de *A. baumannii* (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 y Ab7) y del aislado de *A. calcoaceticus* (AC). Tras 14 horas de incubación a 37°C, se tomaron fotografías de las placas que son representativas de varios experimentos consecutivos.

Los aislados clínicos Ab1, Ab5 y Ab6, solo mostraron motilidad en el medio rico (Figura 29). Ab1 presentó un patrón de motilidad similar a *A. nosocomialis* M2, recubriendo toda la superficie de la placa y sin responder a la acción del QQ. Ab5 y Ab6 presentaron una motilidad muy parecida, expandiéndose de manera irregular con entrantes y salientes en el borde de migración y sin llegar a cubrir toda la superficie entera de la placa. Ambos respondieron a la actividad QQ de la enzima, aunque en menor medida en el aislado Ab6, y la furanona solo logró reducir ligeramente la motilidad en el aislado Ab5. La adición de la AHL solo presentó algo de efecto en Ab5 donde redujo levemente la motilidad de manera similar a la furanona. En el medio bajo

en nutrientes y sal, la furanona produjo una ramificación motil en Ab1, al igual que la OHC12-HSL en la Ab6 (Figura 29).

A diferencia de los anteriores, el aislado Ab7 solo fue capaz de migrar en la superficie de las placas del LBM con un patrón ramificado en forma de tentáculos. La enzima de QQ bloqueó totalmente la motilidad y la furanona y las AHLs no presentaron ningún efecto sobre la misma (Figura 29).

Estos resultados indican una gran disparidad en la respuesta de la motilidad a factores externos, que no se correlaciona con el perfil de AHLs observado en medio líquido. Además, estos resultados han sido publicados y discutidos (López et al. 2017) por lo que no se discutirán en la presente memoria.

5. Motilidad de tipo *twitching* en *A. baumannii*

Debido a que diversas especies del género *Acinetobacter* presentan *twitching* (Eijkelkamp et al. 2011b), un tipo de motilidad en el cual las células bacterianas son capaces de migrar en la interfase entre la capa de agar y una superficie sólida como el fondo de una placa Petri, decidimos evaluar si *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y los mutantes de las sintasas de AHLs de ambas especies presentaban esa capacidad. Como nuestros resultados anteriores de motilidad sobre agar demostraron claras diferencias dependiendo de los diferentes componentes del medio y del tipo de agar, se realizaron diversas pruebas en distintas condiciones. Ambas especies se inocularon mediante picadura en el fondo de las placas con distinto medio de cultivo (LB o LB con 0,5% de sal) y suplementadas con distinto tipo de agar (Difco o Eiken) o agarosa (Sigma) al 1%, a partir de cultivos de 17 horas o directamente de colonias aisladas de placa. Después las placas se incubaron a 37°C en condiciones de alta humedad durante 18 o 48 h.

Como resultado, se obtuvo que *A. baumannii* ATCC17978 no presentó este tipo de motilidad en ninguno de los casos probados al igual que su mutante Δ *abaI* (datos no mostrados). Además, realizamos otro nuevo ensayo en placas Petri de mayor diámetro (150 mm), con 30 mL de triptona al 1%, 0,5% sal y 1% agarosa en vez de agar, ya que Harding et al. (2013) había descrito la presencia de *twitching* en *A. nosocomialis* M2 en esas condiciones. Concordando con sus resultados, M2 consiguió migrar alrededor de 1 cm de diámetro en estas condiciones, mientras que no se observó migración en ATCC17978 (datos no mostrados).

6. Efecto de la sal y agitación a nivel molecular

Por último, tras determinar que las condiciones estáticas de los cultivos en *Acinetobacter* son cruciales para la producción de AHLs y considerando que el medio de cultivo y en especial la salinidad afecta en gran medida tanto a la producción de señales de QS como a la motilidad, se decidió evaluar si estas condiciones tenían un efecto sobre la expresión de los genes de QS y de otros genes relacionados con motilidad, adherencia y virulencia en *A. baumannii* ATCC17978. De esta manera, se realizó una PCR cuantitativa a partir de ARN extraído de cultivos en medio LB o LB con baja sal (0,5%) con o sin agitación (Figura 30). Entre los genes estudiados se encuentra el receptor de AHLs *abaR* de *Acinetobacter*, el gen codificador de la sensora quinasa BfmS perteneciente al sistema de dos componentes BfmRS que regula el operón *csu* (codifica para pili tipo I, relacionado con motilidad y adherencia) (Tomaras et al. 2008), el gen *csuD* que codifica para una proteína guía (*usher protein*) de membrana externa necesaria para la biogénesis de fimbrias o pili de tipo I y es responsable del ensamblaje y extensión del pili (Tomaras et al. 2003), la proteína de membrana externa codificada por *pilT* necesaria para la extensión y retracción de pili tipo IV (Clemmer et

al. 2011), el regulador global *gacS* asociado a virulencia que interviene en el control del operón *csu* (Cerqueira et al. 2014) y podría estar controlado por AHLs (Kang y Park 2010a), el receptor de la luz azul codificado por *blsA* que afecta a la motilidad (Mussi et al. 2010), el represor global codificado por *h-ns*, involucrado en sobre-producción de la motilidad, que se ha postulado que regula el operón de QS (Eijelkamp et al. 2013), y el gen *adeB* que codifica para el transportador de la bomba secretora de antibióticos AdeABC (Marchand et al. 2004).

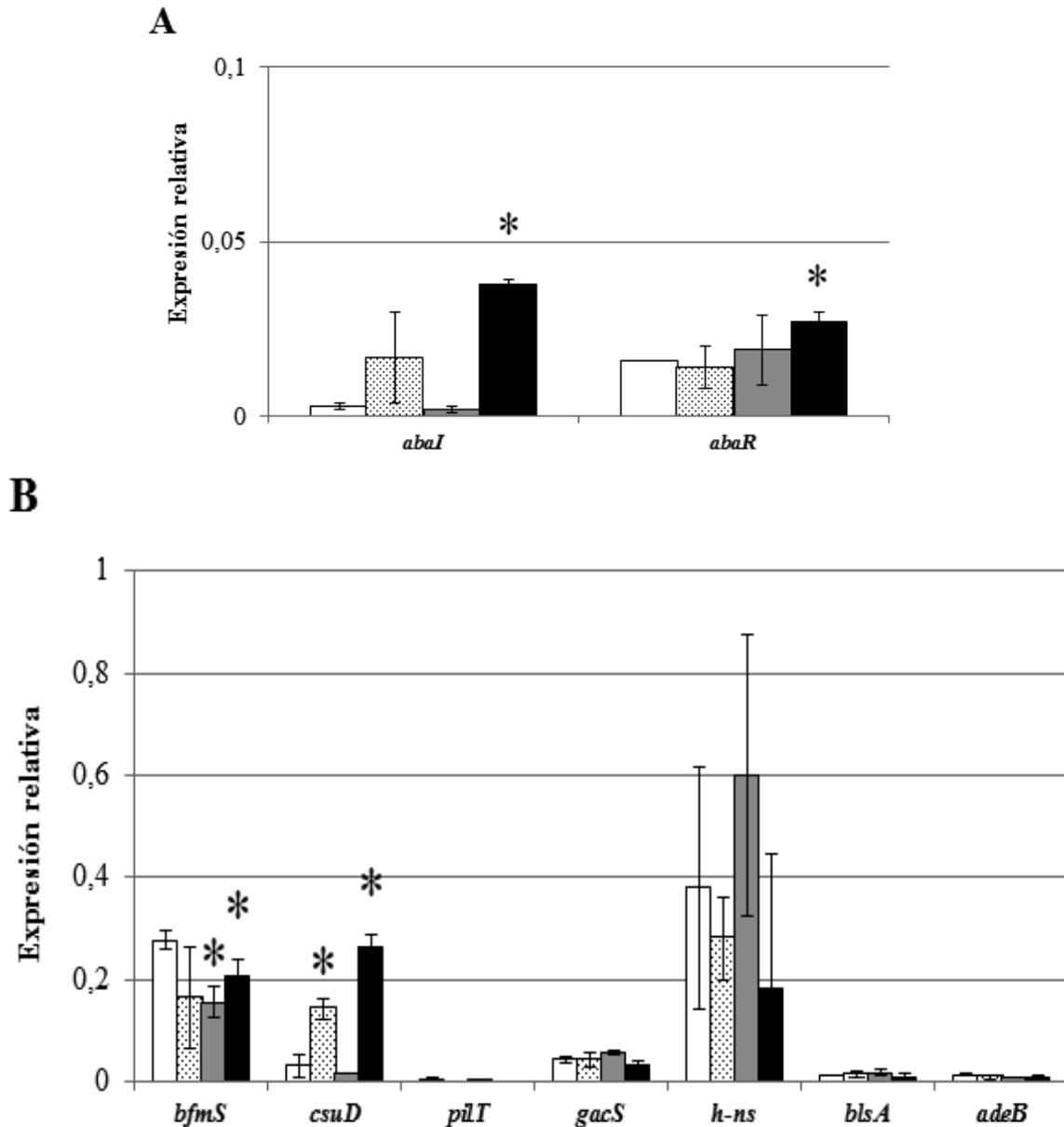


Figura 30. Expresión relativa de los genes A) *abaI* y *abaR*, y B) *bfmS*, *csuD*, *pilT*, *gacS*, *h-ns*, *blsA* y *adeB* de *A. baumannii* ATCC17978 en cultivos de 6 h de LB agitados (barras blancas), cultivos de LB sin agitar (barras punteadas), cultivos de LB con baja sal (0,5%) agitados (barras grises) o cultivos de LB con baja sal sin agitar (barras negras). La expresión del ARNr del gen *rpoB* se usó como control interno. Las barras de error muestran las desviaciones estándar (n=3). Los asteriscos indican la significación frente a la condición del LB en agitación (prueba *t* de Student, $P < 0,05$).

Tabla 5. Niveles de expresión de los genes *abal*, *abaR*, *bfmS*, *csuD*, *pilT*, *gacS*, *h-ns*, *blsA* y *adeB* en *A. baumannii* ATCC17978 en cultivos de LB o LB con baja sal (0,5%) (<NaCl), agitados o sin agitar. Los niveles de expresión de cada gen se determinaron con respecto al nivel de expresión de *rpoB* utilizado como control interno. Los valores se muestran \pm las desviaciones estándar (n=3).

Gen	LB agitado	LB sin agitar	<NaCl agitado	<NaCl sin agitar
<i>abal</i>	0,003 \pm 0,001	0,017 \pm 0,013	0,002 \pm 0,001	0,038* \pm 0,001
<i>abaR</i>	0,016 \pm 0,000	0,014 \pm 0,006	0,019 \pm 0,010	0,027* \pm 0,003
<i>bfmS</i>	0,277 \pm 0,018	0,163 \pm 0,099	0,156* \pm 0,032	0,208* \pm 0,031
<i>csuD</i>	0,032 \pm 0,022	0,141* \pm 0,020	0,016 \pm 0,001	0,263* \pm 0,026
<i>pilT</i>	0,005 \pm 0,002	0,000 \pm 0,001	0,002 \pm 0,000	- \pm 0,000
<i>gacS</i>	0,044 \pm 0,006	0,042 \pm 0,015	0,058 \pm 0,005	0,034 \pm 0,008
<i>h-ns</i>	0,380 \pm 0,236	0,281 \pm 0,082	0,601 \pm 0,275	0,184 \pm 0,261
<i>blsA</i>	0,012 \pm 0,001	0,015 \pm 0,007	0,018 \pm 0,007	0,007 \pm 0,010
<i>adeB</i>	0,013 \pm 0,002	0,008 \pm 0,005	0,008 \pm 0,001	0,010 \pm 0,003

“-“: No amplificado.

*: significativo (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) frente al LB agitado.

Los resultados mostraron que las condiciones estáticas y especialmente las condiciones estáticas en medio LB con baja sal, inducen significativamente (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) la expresión de la sintasa de AHLs *abal* (aumentó 12,5 veces más sus niveles de expresión) (Figura 30A y tabla 5). Sin embargo, solo la reducción de la sal en el medio de cultivo no produjo ningún cambio en la expresión de *abal* en condiciones de agitación. La expresión del receptor *abaR* también aumentó significativamente (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) en condiciones de baja sal sin agitación. Además, el gen *csuD*, una proteína de la membrana exterior necesaria para la biogénesis de fimbrias o pili de tipo I y para la adherencia inicial a la superficie durante la formación de biopelícula (Tomaras et al. 2003, 2008, Clemmer et al. 2011, Luo et al. 2015), presentó un patrón similar de expresión al de la sintasa *abal*, aumentando significativamente (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) su expresión en condiciones estáticas y limitadas por sal (Figura 30B). La sensora quinasa *bfmS* del sistema de dos componentes *bfmRS*, la cual juega un papel crítico en la regulación del pili de tipo I (Tomaras et al. 2008), disminuyó su expresión de forma significativa en condiciones de baja sal en comparación con los cultivos de LB agitados, mostrándose más receptiva a los cambios ambientales (Figura 30). Por otra parte, el regulador global *gacS* y el represor global *h-ns* involucrado en la sobre-producción de la motilidad de *Acinetobacter* no modificaron significativamente su expresión en estas condiciones, al igual que el receptor de luz azul *blsA* y el transportador multidrogas *adeB* de la bomba de eflujo de antibióticos AdeABC de *A. baumannii* (Figura 30). Los niveles de amplificación del gen *pilT*, necesario para la retracción de pili tipo IV (Clemmer et al. 2011), fueron mínimos, por lo que no permiten sacar ninguna conclusión.

7. Efecto de la adición de señales de QS exógenas

Decidimos estudiar el efecto de la señal OHC12-HSL sobre la expresión de distintos genes de *A. baumannii* ATCC17978 relacionados con la virulencia, motilidad y con el propio sistema de QS. De este modo, se realizó una PCR cuantitativa de genes involucrados en dichas funciones a partir de ARN extraído de cultivos de 7 h, suplementados o no con la señal desde el inicio del cultivo durante 7 h (AHL 7 h) y a las 6 h de cultivo durante 1 h (AHL 1 h) (Figura 31).

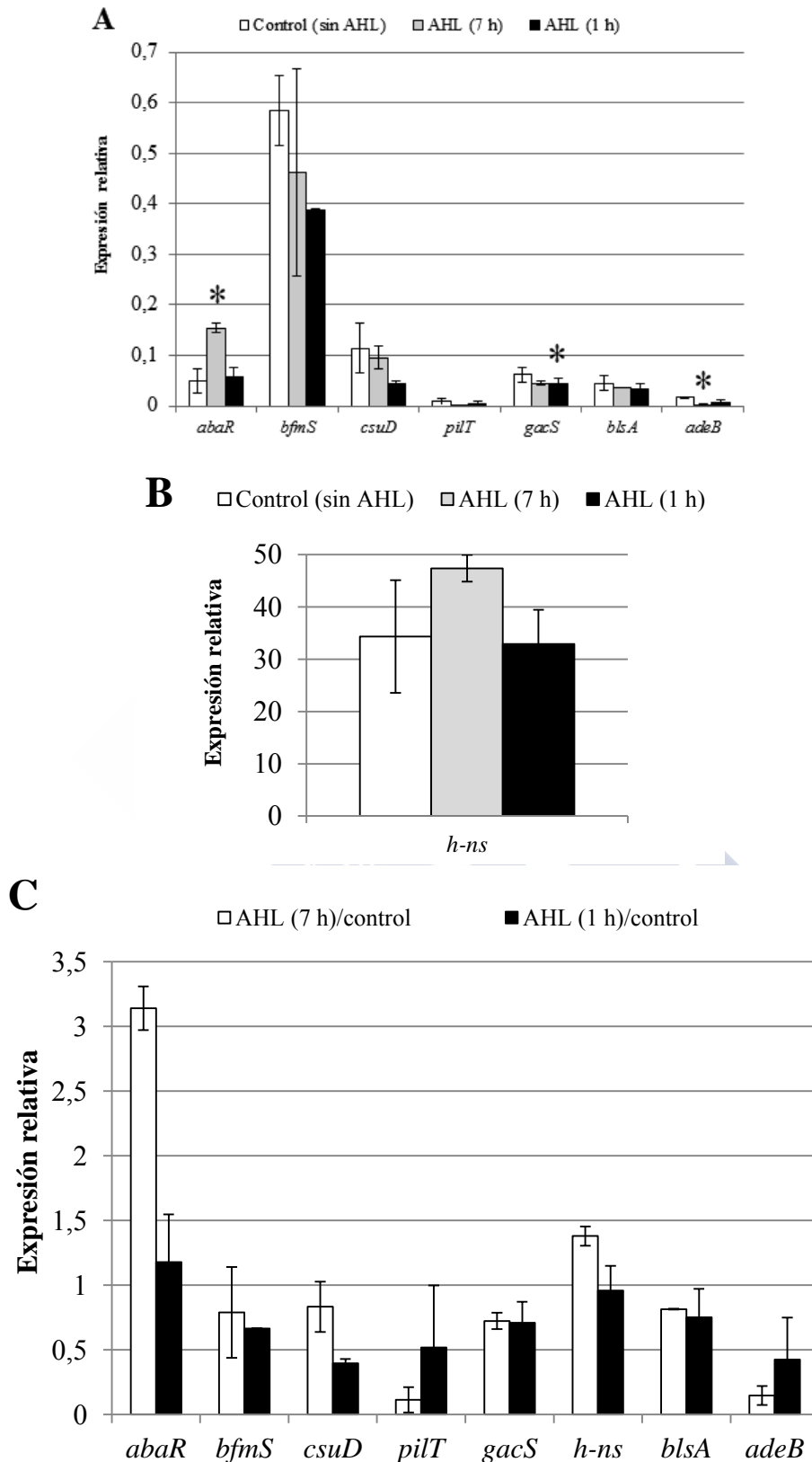


Figura 31. A) Expresión relativa a las 7 h de cultivo de los genes *abaR*, *bfmS*, *csuD*, *pilT*, *gacS*, *hns*, *blsA* y *adeB* de *A. baumannii* ATCC17978 en cultivos de LB con OHC12-HSL (10 μ M) añadida al inicio del cultivo (durante 7 h) o añadida a las 6 h (durante 1 h). Los datos se representan normalizados a los valores obtenidos de cada gen en el control sin AHL. Los valores se normalizaron con respecto a la expresión del gen *rpoB*, utilizado como control interno. B) Los mismos datos se expresaron normalizándolos respecto al control sin tratamiento de AHL. Las barras de error muestran las

desviaciones estándar (n=3). (QQ) indica la actividad QQ demostrada en este trabajo y los asteriscos indican la significación frente al control (prueba *t* de Student, $P<0,05$).

Tabla 6. Niveles de expresión de los genes *abaR*, *bfmS*, *csuD*, *pilT*, *gacS*, *h-ns*, *blsA* y *adeB* en *A. baumannii* ATCC17978 en cultivos de LB con OHC12-HSL (10 μ M) añadida al inicio del cultivo (durante 7) h o a las 6 h (durante 1 h). Los niveles de expresión de cada gen se determinaron con respecto al nivel de expresión de *rpoB* utilizado como control interno. Los valores se muestran \pm las desviaciones estándar.

Gen	Control (Sin AHL)	AHL (7 h)	AHL (1 h)
<i>abaR</i>	0,049 \pm 0,023	0,154* \pm 0,008	0,058 \pm 0,018
<i>bfmS</i>	0,584 \pm 0,068	0,462 \pm 0,205	0,388 \pm 0,002
<i>csuD</i>	0,114 \pm 0,048	0,095 \pm 0,022	0,045 \pm 0,004
<i>pilT</i>	0,008 \pm 0,007	0,001 \pm 0,001	0,004 \pm 0,004
<i>gacS</i>	0,062 \pm 0,014	0,045 \pm 0,004	0,044* \pm 0,010
<i>h-ns</i>	34,328 \pm 10,755	47,375 \pm 2,553	32,888 \pm 6,564
<i>blsA</i>	0,045 \pm 0,015	0,037 \pm 0,000	0,034 \pm 0,010
<i>adeB</i>	0,016 \pm 0,000	0,002* \pm 0,001	0,007 \pm 0,005

*: significativo (prueba *t* de Student, $P<0,05$) frente al control

Como se observa en la figura 31, la adición de la OHC12-HSL en el inicio del cultivo produjo, como era de esperar, una inducción significativa (prueba *t* de Student, $P<0,05$) del receptor de AHL *abaR* y un aumento de la expresión del represor global *h-ns*. Sin embargo, al añadir la OHC12-HSL a las 6 h durante 1 h de exposición con la señal, los niveles de expresión de ambos genes no sufrieron cambios. El resto de los genes estudiados disminuyeron sus niveles de expresión en las dos condiciones, sin embargo, solo la disminución del gen *adeB* fue significativa (prueba *t* de Student, $P<0,05$) al añadir OHC12-HSL al inicio del cultivo (Figura 31).

Discusión

En las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo no pudo ser detectada ninguna señal de QS en ninguna especie ni aislado de *Acinetobacter* cultivado en agitación y solamente en cultivos estáticos fue posible detectar un complejo perfil de AHLs (Tablas 2 y 3). Este hecho podría revelar una posible relación entre el QS y las condiciones que promueven la adherencia celular, debido al incremento de los niveles de expresión de la sintasa *abaI*, del receptor de AHLs *abaR* y del gen *csuD*, en estas condiciones y en especial con baja concentración de sal en *A. baumannii* ATCC17978. La correlación entre la producción de AHLs en ATCC17978 y el crecimiento en condiciones estáticas explica, además, que en estas condiciones se produzca un incremento de las AHLs en los cultivos (Figura 26) y una mayor motilidad asociada a superficie, descartando que la ausencia de la producción de AHLs observada en los cultivos agitados a lo largo de todo este trabajo esté causada por una rápida eliminación de las señales. Además, el patrón de expresión similar de *csuD* y *abaI* bajo condiciones estáticas encontrado en este estudio, concuerda con la inducción de la expresión de genes estructurales de pili, incluyendo *csuD* y el aumento de estructuras de tipo pili alrededor de la bacteria cuando se añaden AHLs exógenamente a *A. baumannii* ATCC19606^T (Luo et al. 2015). Sin embargo, como los propios autores afirman, añadieron una AHL no específica del receptor *abaR* (C6-HSL) (Luo et al. 2015), por lo que se podría estar subestimando el efecto producido.

Hasta lo que conocemos, este es el primer estudio donde se describe que las condiciones de cultivo estáticas son necesarias para la detección de AHLs en una especie bacteriana. Este hallazgo podría explicar la ausencia de AHLs en los sobrenadantes de la mayoría de 55 aislados clínicos de *Acinetobacter* encontrado en un trabajo previo, en los cuales solo C10 y C12-HSL fueron confirmadas en 5 y 2 aislados, respectivamente (Anbazhagan et al. 2012). En otras bacterias como *E. coli* O157:H7 se ha descrito el requerimiento de señales mecánicas para detectar la superficie de las células del hospedador (Alsharif et al. 2015). Otro ejemplo es el de *P. aeruginosa*, donde el QS es necesario, pero no suficiente para activar la virulencia (Siryaporn et al. 2014). De hecho, las células planctónicas de *P. aeruginosa*, aunque tengan activado el sistema de QS, no presentan virulencia si no están adheridas a una superficie (Siryaporn et al. 2014). En *P. aeruginosa* se ha demostrado que los pili de tipo IV además de participar en la adhesión y motilidad, pueden actuar como un sensor mecánico de superficie (Persat et al. 2015), requiriendo la adhesina de superficie PilY1 que detecta señales mecánicas de las superficies mediante el contacto entre la membrana celular externa y la superficie del sustrato actuando como un mecanotransductor. En este caso, la detección o percepción de la superficie y el QS son vías independientes de señalización que actúan conjuntamente para regular la expresión de los factores de virulencia (Siryaporn et al. 2014). En *A. baumannii* ATCC17978, el operón *csu* y el operón de QS (A1S_0112-A1S_0119) se sobre-expresan en células aisladas de biopelícula en comparación con células planctónicas y en especial, el gen A1S_0114, que codifica para una ACP esencial para la síntesis de AHLs, se expresa exclusivamente en biopelícula mientras que se inhibe su expresión totalmente en células planctónicas (Rumbo-Feal et al. 2013). Para la activación de ACP son necesarias la sintetasa acyl-CoA (A1S_0112) y la deshidrogenasa acyl-CoA (A1S_0113) presentes en el mismo operón. Recientemente se ha descrito que el gen A1S_0114 del operón no solo resulta en una menor producción de biopelícula si no en una menor adherencia a células epiteliales alveolares humanas, relacionando de nuevo el operón de QS con la adherencia celular (Rumbo-Feal et al. 2017). Se ha sugerido que el operón de QS podría

estar regulado por otros factores como el AMPc (Giles et al. 2015), por lo que podría hipotetizarse que esta molécula funcionase como mensajera del hipotético sensor de superficie. En *P. aeruginosa* un sistema de dos componentes denominado Chp regula los pili de tipo IV, que actúan como mecanosensores de superficie, a la vez que regula el AMPc (Persat et al. 2015). El AMPc a su vez, activa el QS, entre otros muchos genes, a través del regulador de factores de virulencia Vfr (*virulence factor regulator*) (Persat et al. 2015). Recientemente, en *A. baumannii* ATCC17978 se ha descrito el sistema de dos componentes CheA/Y, homólogo de los componentes CheA en *E. coli* y Chp de *P. aeruginosa* (Whitchurch et al. 2004, Chen et al. 2017). En ATCC17978, este sistema se ha relacionado con la motilidad y formación de biopelícula, ya que un mutante de CheA (A1S_2811) produce inhibición de motilidad de superficie y película en la interfase aire-líquido y biopelícula (Chen et al. 2017). Estos autores sugieren ya que CheA podría regular la producción de motilidad y biopelícula mediante la regulación del operón *csu* y el operón de QS, ya que en *A. baumannii* la motilidad asociada a superficie no ha podido ser asociada con la retracción de pili de tipo IV (Chen et al. 2017). De hecho, la transcripción de *abaI* y otros genes del operón de QS y de *csu* disminuyen en el mutante de CheA mientras que genes de pili de tipo IV no se encuentran afectados y la biopelícula y la motilidad son restauradas cuando se añaden exógenamente 100 μ M de OC10-HSL al mutante (Chen et al. 2017), especulando que este sistema podría estar regulando el operón de QS a través de la regulación de AbaI (Chen et al. 2017). Sin embargo, no se llegó a analizar la producción de AHLs en el mutante. A pesar de que se desconoce si actúa como un mecanosensor de superficie en *Acinetobacter*, la presencia de éste o un mecanismo similar podría explicar el patrón observado en la producción de AHLs exclusivamente en condiciones estáticas, aunque se necesitaría mayor investigación para poder determinarlo.

Los análisis de HPLC-MS revelaron que OHC12-HSL es la señal mayoritaria encontrada en *A. baumannii* ATCC17978 así como en *A. nosocomialis* M2, en común con la literatura publicada para M2 (Niu et al. 2008). En los aislados clínicos de *A. baumannii* y de *A. calcoaceticus* también se identificaron grandes cantidades de OHC12-HSL en condiciones estáticas además de diferentes señales adicionales (Tabla 3). En *A. nosocomialis* ATCC17903^T, donde se identificaron *anoI* y *anoR* como la sintasa y receptor de AHLs, también se detectó mediante análisis espectrométricos la secreción de OH-dDHLs en sobrenadantes extraídos (Oh y Choi 2015). Sin embargo, en el aislado clínico *A. baumannii* S1, la señal mayoritaria identificada fue la OHC10-HSL y no la OHC12-HSL (Chow et al. 2014), sugiriendo una variación intraespecífica además de interespecífica de la producción de señales de QS, como detectamos también en nuestras cepas.

Aparte de OHC12-HSL identificamos varias señales adicionales en menores concentraciones. En el medio rico en nutrientes la OHC10-HSL fue la segunda señal más abundante en ATCC17978 además de otras 5 señales, mientras que en M2, C8-HSL fue la señal adicional más abundante seguida por cantidades pequeñas de otras 6 AHLs (Tabla 2). Niu et al. (2008) observaron la presencia de varias AHLs en M2, en extractos concentrados preparados a partir de cultivos de 500 mL, mediante cromatografía de capa líquida con el biosensor *A. tumefaciens* traG-lacZ, que más tarde identificaron por HPLC-MS como OHC12-HSL como la señal prioritaria y cinco señales adicionales en menor cantidad. Cuando sobre-expresaron la sintasa de *abaI* en *E. coli* identificaron OHC12, C10, C12 y OHC10 por HPLC-MS (Niu et al. 2008). Por el contrario, en nuestros ensayos M2 presentó 7 señales adicionales de cadena larga y corta, de las cuales 5 fueron diferentes (Tabla 2).

Todo apunta a que existe una gran dificultad de asignar específicamente las señales de QS a una especie en particular del género, ya que diversos estudios han descrito variaciones en las señales de QS producidas por especies de *Acinetobacter* spp. usando diferentes especies y medios, encontrando en la mayoría de los casos más de una AHL coincidiendo con nuestros datos de HPLC-MS. Sobrenadantes de *A. calcoaceticus* BD43 y de dos aislados clínicos de *Acinetobacter* produjeron 4 señales detectables en cromatografía en capa líquida con diferente patrón según la especie y el medio de cultivo (González et al. 2001). En sobrenadantes de *Acinetobacter junii* BB1A se detectaron AHLs derivadas de 3-oxo y 3-hidroxi mediante el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (Sarkar y Chakraborty 2007). En un estudio acerca de 43 cepas de 20 especies distintas de *Acinetobacter*, sus autores no pudieron asignar ninguna de las 3 señales de QS, que encontraron agrupadas en tres grupos cromatográficos distintos, a ninguna especie del complejo ACB (González et al. 2009). Sin embargo, otros autores sugirieron que el complejo ACB produce, como rango distintivo del grupo, AHLs de cadena larga, ya que no encontraron C4-C6 AHLs en ninguna de las 9 cepas ambientales y hospitalarias de *Acinetobacter* sp. (Bitrian et al. 2012). Recientemente, se ha observado distinto perfil de AHLs entre especies aisladas de suelo o del ambiente intrahospitalario, produciendo estas últimas mayor número de señales (Erdönmez et al. 2017). C10, C12, C14 y C16-HSL solo fueron identificadas en los aislados nosocomiales, sugiriendo un papel de las AHLs de cadena larga en la virulencia de *Acinetobacter* spp. (Erdönmez et al. 2017). En contraste con estos datos, en ATCC17978 y M2 hemos identificado algunas AHLs de cadena corta, reforzando que el perfil de AHLs no puede ser utilizado como un carácter taxonómico o diferencial. Como indican varios autores, no encontrar señales de cadena corta en los cultivos de *Acinetobacter* sp. no significa que no las produzca, sino que puedan estar degradándolas mediante mecanismos enzimáticos impidiendo su detección (Chow et al. 2014, Erdönmez et al. 2017).

Cabe destacar, que tras las 17-24 h de cultivo, se observó una caída de la producción de todas las señales de QS tanto en *A. baumannii* ATCC17978 como en *A. nosocomialis* M2. Ya se ha descrito una correlación de la producción de las señales de QS con el tiempo del cultivo, detectando la máxima producción de señales en la fase estacionaria (González et al. 2001). La disminución brusca de la producción de QS podría deberse a la presencia de QQ en *Acinetobacter*, actividad ya descrita en varias especies del género a lo largo de la bibliografía y que se explicará detalladamente en el siguiente capítulo.

Además, también existe una variación de la intensidad de la señal entre especies distintas ya descrita por otros autores (*A. pittii* produce señales de QS detectables en solo 1 mL de sobrenadante de cultivo mientras en otras especies se necesitan entre 5 y 30 mL para identificarlas) (Bitrian et al. 2012). En este estudio se necesitaron extracciones de 100 mL de sobrenadantes de cultivos para conseguir la identificación de cantidades del orden nanomolar de AHLs mediante HPLC-MS (Tabla 2). Estas diferencias pueden depender de las condiciones y medios de cultivo. No obstante, estos resultados contrastan con otras bacterias Gram-negativas donde el orden de producción de AHLs es bastante mayor: *Edwardsiella tarda* por ejemplo, produce hasta 4 μ M de OC6-HSL a las 24 h (Romero et al. 2014), *Serratia liquefaciens*, alrededor de 0,7 μ M de C4-HSL a las 24 h de cultivo (Remuzgo-Martínez et al. 2015). Hay que añadir que otros autores no fueron capaces de detectar señales de QS en *Acinetobacter* sp. C1010 mediante bioensayo con *A. tumefaciens* NT-1 (Kang et al. 2004) al igual que en distintas cepas de *Acinetobacter* aisladas de lentes de contacto mediante *C. violaceum* y *A. tumefaciens* A136 (Zhu et al. 2001), explicando nuestra falta de resultados con los biosensores.

En este trabajo observamos que el perfil de señales detectado está sujeto a un efecto del medio de cultivo. En condiciones limitantes de nutrientes, observamos una reducción de las señales adicionales en ambas especies y en todos los aislados analizados, en comparación con el medio rico en nutrientes (Tablas 2 y 3). Sin embargo, ATCC17978 y M2 producen cantidades similares de la AHL mayoritaria OHC12-HSL en ambos medios. El efecto del medio de cultivo sobre la producción de AHLs en *Acinetobacter* ya ha sido descrito en la bibliografía. Suplementando el medio de cultivo con triptona al 1%, se produce una disminución en la concentración de señales detectadas en los sobrenadantes de *A. calcoaceticus* BD43 y otros aislados clínicos de *Acinetobacter* sp. (González et al. 2001). Debido a que el medio LBM utilizado en este trabajo tiene menor concentración de triptona, de sal y de extracto de levadura, la baja densidad celular alcanzada en las curvas de crecimiento especialmente en M2 (Figura 8) podría ser una razón para explicar el menor número de AHLs identificadas en HPLC-MS. Además, cuando reducimos solo la concentración de la sal en el medio, la producción de AHLs se incrementa considerablemente en *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 26), explicando que *A. baumannii* ATCC17978 presente una sobre-producción de motilidad asociada a superficie en estas condiciones (Figura 21). Las condiciones de pH controlado aumentaron considerablemente la concentración de señales de QS en ATCC17978 siendo más efectiva la posible recuperación de las señales gracias al mantenimiento del pH, aunque no evitaron la degradación de las señales a partir de las 17-24 h. En M2, sin embargo, no se observó casi producción de AHLs controlando el pH del medio, aunque las curvas de crecimiento fueron bastante similares. Esta observación constituye una importante característica diferencial con respecto al control de la producción de AHLs observado en ATCC17978. En *Streptococcus mutans*, el pH ácido puede alterar la expresión genética incluyendo el sistema de QS (Gong et al. 2009). Además, se ha especulado que la reducción de señales de QS puede ocurrir por cambios en la fluidez de la membrana celular debido a pH bajo, temperatura, tratamiento a antibióticos u otros factores ambientales (Kang y Park 2010b). Esto podría explicar la alteración del perfil de AHLs en M2 en estas condiciones.

Hay que añadir que no se detectó ninguna señal en sobrenadantes de los mutantes de las sintasas, ni de *A. baumannii* ATCC17978 ni de *A. nosocomialis* M2, tanto en cultivos agitados o no, indicando que *AbaI* es la única sintasa responsable de la producción de AHLs en ambas especies en línea con los trabajos de autores anteriores (Niu et al. 2008, Bitrian et al. 2012, How et al. 2015), o al menos aquella de mayor relevancia, ya que no se puede descartar que existan otras bajo el control de *AbaI*. Distintos análisis de los genes *abaI* y *abaR* revelaron la existencia de copias simples de la sintasa y del receptor de AHLs con alta homología de secuencia entre ellas y alta similitud con la familia LuxI/R en diversas especies y aislados de *Acinetobacter* (Bhargava et al. 2010, Bitrian et al. 2012, Anbazhagan et al. 2012, How et al. 2015). Además, las sintasas de AHLs están altamente conservadas mostrando un alto grado de homología entre especies ambientales y nosocomiales (How et al. 2015). Pero no se podría descartar la existencia –poco probable– de una sintasa desconocida *aguas abajo* de *AbaI*, como ocurre en *P. aeruginosa*, aunque en este caso la mutación de su sintasa principal *LasI*, no anula por completo la producción de señales (Lee y Zhang 2015). Coincidiendo con estos trabajos, los fragmentos amplificados de las sintasas de todas las especies y aislados analizadas en este trabajo presentaron elevada homología de secuencia al igual que los de los receptores de AHLs (Figuras 14 y 15). A pesar de que se ha postulado que otros tipos de AHL podrían ser sintetizados por *Acinetobacter* a través de la acción de aciltransferasas (Niu et al. 2008), la secuencia completa de los genomas de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 parece indicar que la

sintasa *abaI* y los genes del operón de QS podrían ser los únicos candidatos involucrados en la producción de diferentes AHLs (Smith et al. 2007, Carruthers et al. 2013). Un rasgo a destacar es la presencia de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos colocados *aguas arriba* y *aguas abajo* de las regiones de los homólogos de *abaI/abaR* (Kang y Park 2010a, How et al. 2015). Esto podría indicar el uso de metabolitos de la maquinaria biosintética de ácidos grasos como precursores del anillo lactona y del grupo acilo de la AHL en estas especies (Val y Cronan 1998, How et al. 2015). El elevado número de AHLs confirma la baja especificidad de sustrato de la sintasa de AHLs *abaI* (Niu et al. 2008, Bitrian et al. 2012). Además, la razón de la producción de diversas AHLs aún se desconoce. Estos patógenos podrían usar ciertas AHLs dependiendo de las funciones bacterianas que desempeñen, lo que explicaría el complejo perfil de AHLs en especies de *Acinetobacter*. A pesar de que se ha especulado que OHC12-HSL es la señal específica de QS del receptor de AHLs en *A. oleivorans*, denominado AqsR (Kim y Park 2013), las especies de *Acinetobacter* podrían estar usando sus señales de QS adicionales para interactuar con otras bacterias con el objetivo de adquirir ventajas competitivas o para regular la expresión de diferentes genes dependiendo de la unión con una u otra AHL. Un ejemplo es la comunicación cruzada que realiza *A. nosocomialis* M2 con *P. aeruginosa* gracias a la flexibilidad de los receptores AbaR y LasR a AHLs de 12 carbonos (Bhargava et al. 2012). El receptor *abaR* de *A. nosocomialis* M2 es capaz de responder a AHLs autólogas o heterólogas, las cuales pueden diferir en su estructura química, de modo que AHLs de cadena larga, propias o no, son capaces de restablecer la arquitectura de la biopelícula del mutante Δ *abaI* en esta especie (Bhargava et al. 2014). Del mismo modo, *Acinetobacter* podría utilizar las distintas AHLs que produce como agonistas o antagonistas del receptor *abaR* para modular distintas funciones. Otra hipótesis podría ser que estos patógenos regulen la expresión de genes de virulencia integrando la información a partir de las distintas señales, sin descartar que existan otros receptores/sensores para estas AHLs adicionales que no sean de tipo LuxR.

La disponibilidad de nutrientes modifica drásticamente el patrón de motilidad de *Acinetobacter* (Figuras 17, 20 y 21). *A. baumannii* ATCC17978 presenta un patrón ramificado en tentáculos en condiciones de motilidad permisivas. Este patrón de motilidad arborescente de *Acinetobacter* creando canales en el medio semisólido había sido asociado a un efecto físico provocado por el tipo y porcentaje de agar, además del tipo de nutrientes utilizados (Barker y Maxted 1975). Las diferencias de motilidad en superficie observadas en este trabajo, entre medios con diferente disponibilidad de nutrientes, ya ha sido observada en ATCC17978 que presentó distintos patrones de motilidad en LB y en el medio M9 (medio mínimo de sales) suplementados con agarosa (McQueary et al. 2012). Igualmente, la limitación del hierro en el medio de cultivo inhibe la motilidad en *A. baumannii* ATCC17978 en placas de LB con 0,25% de agar (Eijelkamp et al. 2011), apoyando la importancia del medio de cultivo en la motilidad en esta especie. Las discrepancias entre los fenotipos de motilidad observados derivados de los cambios en la disponibilidad de nutrientes podrían indicar cambios en la producción de moléculas asociadas a motilidad, incluyendo LPSs y exopolisacáridos (McQueary et al. 2012, Skiebe et al. 2012), así como la poliamina DAP que tiene un papel crucial en la motilidad de este patógeno y ha sido asociada a tolerancia a desecación en *A. baumannii* (Skiebe et al. 2012).

Coincidiendo con la concentración idónea de agar para caracterizar la motilidad establecida en este capítulo (0,25%) (Figura 17): otros autores tampoco observaron motilidad en *A. baumannii* ATCC17978 con agar a mayores porcentajes (Eijelkamp et al. 2011b). El efecto del tipo de agar ya fue descrito por otros autores que observaron

que la agarosa frente al agar granulado o el agar Noble propiciaba mayor motilidad en diferentes aislados de *A. baumannii* (McQueary et al. 2012). Del mismo modo, Clemmer et al. (2011) describieron variaciones en el fenotipo motil de *A. nosocomialis* M2 según el tipo de agar utilizado, pero al contrario que nuestros resultados de M2 (Figura 17), en el medio bajo en nutrientes el fenotipo ramificado fue observado en agar Difco y el expandido en agar Eiken (Clemmer et al. 2011). Aunque el contenido de sal en el agar Difco es alrededor de 3,5 veces mayor que en el agar Eiken (1,75% de contenido de cenizas), esta diferencia no podría explicar los cambios observados en la motilidad, ya que la concentración utilizada en los ensayos (0,25%) no produce un aumento considerable de la salinidad del medio. Una mejor humectabilidad del agar Eiken, la cual ayudaría a que la bacteria se adhiera o se deslice sobre la superficie semisólida sin repelerse, o la presencia de compuestos específicos en el agar que induzcan la motilidad bacteriana, podrían ser explicaciones más plausibles (Clemmer et al. 2011).

Entre los componentes del medio de cultivo utilizado en ensayos de motilidad con *A. baumannii* ATCC17978 en este trabajo, la sal fue la principal responsable del cambio de fenotipo motil en esta especie, promoviendo una sobre-producción de motilidad cuando está a baja concentración en el medio, estando asociada a un claro incremento de AHLs en estas condiciones (Figura 26). Mientras que en M2 la triptona, principal componente del medio, y no tanto la sal fue la que produjo la variación del patrón de motilidad del medio rico al fenotipo ramificado en tentáculos en el medio limitado por nutrientes (Figura 21).

A pesar de que la exposición a la sal induce una cascada reguladora que resulta en último término en una menor susceptibilidad a los antibióticos en *A. baumannii*, un ambiente salino podría inducir una respuesta a estrés en esta bacteria y acabar impidiendo su motilidad (Hood et al. 2010, McQueary et al. 2012). Sin embargo, la sustitución de la sal por la sacarosa produjo un efecto inhibitorio similar sobre la motilidad de *Acinetobacter* (Figura 22, tabla 4), sugiriendo que las condiciones de alta osmolaridad y no simplemente la fuerza iónica del medio de cultivo, bloquean la motilidad asociada a superficie en esta bacteria. En *Vibrio cholerae* la alta osmolaridad del medio también activa la formación de biopelícula y reprime la motilidad a través del regulador, *OscR* (*osmolarity controlled regulator*) que modula la transcripción de genes relacionados con estos procesos de forma directamente proporcional a la salinidad (Shikuma y Yildiz 2009), sugiriendo que la osmolaridad del medio puede estar actuando como una señal ambiental clave para regular el estilo de vida en estos patógenos.

La motilidad en superficie de *A. baumannii* y *A. nosocomialis* también se vio afectada de manera distinta por mutaciones en sintasas de AHLs y estrategias de QQ. El mutante Δ *abaI* en *A. baumannii* ATCC17978 fue incapaz de migrar sobre medio semisólido en ninguna condición y en ninguno de los ensayos realizados en este estudio (Figuras 17, 20, 21 y 24), indicando claramente una influencia del QS sobre la motilidad en esta especie. Además, la adición de la AHL mayoritaria de *A. baumannii* (OHC12-HSL) restauró el fenotipo motil en el mutante Δ *abaI* de ATCC17978 (Figura 20), confirmando esta hipótesis. Concordando con este resultado, la suplementación de OHC12-HSL al cultivo, activó significativamente los niveles de expresión del receptor de AHLs *abaR* en *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 30). Varios estudios previos también apoyan una relación entre el sistema de QS dependiente de AHLs y la motilidad en *A. baumannii*. En un análisis del transcriptoma de una variante de *A. baumannii* ATCC17978 con sobre-producción de motilidad (ATCC17978hm), que presenta interrumpido el gen *hns* que codifica para la proteína reguladora de tipo histona H-NS, se observó un gran aumento de la expresión de la sintasa *abaI* y del receptor de

AHLs *abaR* en comparación con la cepa silvestre (Eijkelkamp et al. 2013). Además, análisis bioinformáticos revelaron que los genes del operón de QS son dianas potenciales del represor global H-NS (Eijkelkamp et al. 2013). Asimismo, los mutantes de los genes A1S_0112 (acil-CoA sintetasa) y A1S_0115 (sintasa de péptidos no ribosomales), que forman parte del operón de QS, resultaron en la inhibición de la motilidad en ATCC17978 (Giles et al. 2015). Por el contrario, el mutante *ΔabaI* de *A. nosocomialis* M2 presentó en todos los experimentos una motilidad similar a la cepa parental en las condiciones utilizadas en este trabajo (Figuras 17, 20, 21 y 24). Aunque estos resultados contradicen la alteración de motilidad observada para diferentes mutantes en el sistema de QS en *A. nosocomialis* en trabajos previos (Clemmer et al. 2011, Oh y Choi 2015), posiblemente esta discrepancia se deba a diferencias en las condiciones del ensayo, particularmente la temperatura utilizada. Así una reducción de temperatura de 37°C a 30°C en los experimentos de motilidad en medios con baja sal demostró que el sistema QS dependiente de AHL también está involucrado en la regulación de este fenotipo en M2 (Figura 23).

La inhibición de QS representa una interesante estrategia antipatogénica para el control de infecciones bacterianas (Romero et al. 2015) y en las últimas décadas la atenuación de virulencia bacteriana mediante la aplicación de enzimas de QQ ha centrado los esfuerzos de numerosos grupos de investigación. En relación al género *Acinetobacter*, existen varios trabajos que exploran la utilización de estrategias de QQ para el control de su patogenicidad. Un ejemplo es el uso de lactonasa de AHLs para impedir la formación de biopelícula de *A. baumannii* (Chow et al. 2014, Zhang et al. 2017). Análogos de AHLs también pueden atenuar el QS en *A. nosocomialis* M2, así como AHLs que pueden bloquear el receptor de AHLs. Entre ellos, el antagonista más potente de *abaR* encontrado en ese trabajo, OC8-HSL, inhibe fuertemente la motilidad (Stacy et al. 2012). Análogos de AHLs que contienen triazol mostraron actividad agonista o antagonista de QS en la especie M2 (Stacy et al. 2013). La actividad QQ de *Glycyrrhiza glabra*, relacionada con la producción de flavonoides, disminuye la expresión de *abaI* al mismo tiempo que atenúa la virulencia regulada por QS de *A. baumannii* (Bhargava et al. 2015). En nuestro caso, la adición de la lactonasa de QQ Aii20J al medio, tras previa confirmación de su capacidad de degradación de las AHLs mayoritarias producidas por *A. baumannii* (Figura 19), inhibió por completo la motilidad de ATCC17978 (Figuras 20, 21, 24 y 25), reafirmando el papel clave del QS en la motilidad de esta especie. Sin embargo, este efecto se vio enmascarado en medio con baja sal (Figuras 21 y 25) donde probablemente la concentración de enzima utilizada no pudo contrarrestar el efecto de sobre-producción de motilidad producido por la baja concentración de sal y derivado de la alta producción de AHLs en baja NaCl (Figura 26). Por el contrario, la furanona C-30 usada como referencia de un inhibidor de QS (Givskov et al. 1996), no produjo ningún efecto en ninguna especie ni condición sugiriendo que este antagonista de receptor de AHL tipo LuxR no compite de forma eficiente con OHC12-HSL por el sitio de unión de *AbaR* y por tanto su efecto no es lo suficientemente potente comparado con el efecto de degradación de señal de Aii20J. En cuanto a *A. nosocomialis* M2 y en conformidad con el efecto de la mutación de la sintasa *abaI* sobre la motilidad en esta especie, ni la enzima de QQ Aii20J, ni la furanona, modificaron el fenotipo de motilidad de esta especie sobre medio semisólido en ensayos a 37°C. Indicando una vez más que, al menos en estas condiciones, debe haber otros factores influyendo en la regulación de la motilidad de esta especie aparte del QS.

Por otra parte, la variación intraespecífica e interespecífica de la motilidad asociada a superficie que observamos entre los distintos aislados estudiados en este trabajo no se

puede atribuir a los distintos perfiles de AHLs, ya que aislados que no presentaron motilidad también presentaron OHC12-HSL entre otras señales. De acuerdo con la teoría de que el receptor de AHLs pueda usar otras señales aparte de la OHC12-HSL, es posible que intervengan otras AHLs producidas por *Acinetobacter* en la producción y/o modulación de la motilidad asociada a superficie. De todas formas, en la mayoría de ellos, el QS desenvuelve un papel importante en el desarrollo de la motilidad asociada a superficie, ya que la enzima de QQ Aii20J presenta un efecto inhibitorio de la motilidad en la mayor parte de los aislados de *A. baumannii* y en el aislado de *A. calcoaceticus* (Figura 29), apoyando la viabilidad de la utilización del QQ como una estrategia de control de la virulencia de este género.

El mutante $\Delta adeB$ presentó un aumento de la capacidad motil respecto a la cepa parental, con migración en todos los medios utilizados, modificando además su patrón de motilidad en cada uno de ellos. Además, respondió al QQ de Aii20J al igual que la cepa parental en todos los casos, salvo en el medio con baja sal, en el cual también se produce un fenotipo con sobre-producción de motilidad que la actividad de Aii20J no es capaz de contrarrestar (Figuras 27 y 28). Esto podría explicarse con la teoría que relaciona las bombas de eflujo de antibióticos y el QS, ya que en la cepa parental estaría permitiendo el paso de la OHC12-HSL con prioridad a otras AHLs y en el mutante de la bomba podría estar modificada esta selectividad en la membrana, el mutante $\Delta adeB$ no expulsaría las AHLs permitiendo la unión del receptor con otras AHLs inespecíficas aumentando los niveles de motilidad sin regulación ninguna y explicando la mayor capacidad de migración que la cepa parental (Figura 27). Por otra parte, el mutante $\Delta adeB$ presenta un perfil de AHLs con menor número de señales de QS adicionales y a menor concentración que la cepa parental, lo que podría apoyar que las AHLs se queden en el interior de la célula debido al fallo de la bomba de eflujo y no sean detectables en el sobrenadante (Tabla 3). Además, cuando se añade OHC12-HSL al inicio del cultivo, los niveles de expresión del gen *adeB* disminuyen significativamente (Figura 31), pudiendo explicar que cuando hay suficiente concentración de la AHL específica del receptor AbaR en comparación con otras, la bomba de antibióticos podría dejar de expresarse. Recientemente se ha descrito que los niveles de expresión de los genes *adeA* y *adeB* de la bomba de antibióticos AdeABC disminuyeron en el mutante de la sintasa *abaI* de *A. baumannii* AbS, recuperando su expresión normal al añadirle OHC12-HSL de manera exógena (Dou et al. 2017), indicando una relación contraria a la observada en este trabajo. El mutante $\Delta adeB$ podría estar usando las AHLs adicionales no específicas del receptor *abaR* de *A. baumannii* ATCC17978, que sean capaces de activar el sistema de QS, amplificando su efecto sobre la motilidad en esta especie, como se ha visto que un mutante *mexB* de la bomba MexAB-OprM de *P. aeruginosa* responde a AHLs producidas por *Vibrio anguillarum* distintas de las que normalmente en su sistema de QS (Minagawa et al. 2012).

En trabajos anteriores se habían observado variaciones en motilidad de *A. baumannii* ATCC17978 tras exposición de cultivos a luz azul, siendo este efecto dependiente de la temperatura de incubación, ya que solo se produce la inhibición a 24°C, a través de la proteína fotorreceptora BlsA, pero independiente de un efecto sobre la viabilidad o crecimiento del cultivo (Mussi et al. 2010, Golic et al. 2013). Otros autores también encontraron inhibición de motilidad por luz azul en otras cepas pertenecientes al complejo ACB, sugiriendo esta característica como particularidad del grupo (Bitrian et al. 2012). En contraste con estas observaciones, la exposición a luz azul no afectó a la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978 en ninguna de las condiciones ensayadas en este trabajo (Figura 24). Únicamente a 25°C, la luz azul inhibió totalmente la motilidad de *A. nosocomialis* M2 en el medio rico en

nutrientes aunque promoviéndola ligeramente en LBM. La disminución del crecimiento de la bacteria a 25°C podría estar subestimando el efecto de la luz azul a menores temperaturas, explicando que no se produjesen cambios en esta condición. Además, no se observaron cambios en los niveles de expresión de *blsA* en las condiciones que promueven la producción de señales de QS (Figura 30), por lo que tampoco se puede relacionar directamente este gen con el QS.

La exposición al inhibidor de pili tipo IV virstatina no produjo ningún efecto sobre la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978 en las condiciones estudiadas en este capítulo (Figura 25), a pesar de que esta molécula había sido descrita anteriormente como un agente bloqueante de la migración en superficie debido a una inhibición de biogénesis de pili en esta especie (Nait Chabane et al. 2014b, Oh y Choi 2015), aunque algunos autores han propuesto que la virstatina podría interactuar directamente con el receptor de AHLs (Oh y Choi 2015, Nicol et al. 2018). Por otra parte y coincidiendo con los resultados de un estudio anterior (Eijelkamp et al. 2011b), no se observó motilidad *twitching*, un tipo de migración dependiente de pili tipo IV, en ninguna condición ensayada en este estudio (diferentes tipos de agar/agarosa y/o medios de cultivo) en *A. baumannii* ATCC17978 (datos no mostrados). Por el contrario *A. nosocomialis* M2 alcanzó alrededor de 1 cm de diámetro de *twitching* en placas de agarosa 1% (datos no mostrados), coincidiendo con los datos obtenidos para esta especie en un estudio previo (Harding et al. 2013). Estos resultados en conjunto podrían indicar que la motilidad en superficie semisólida de *Acinetobacter* no depende únicamente de pili. Es necesario señalar que en este trabajo la virstatina se añadió directamente al inóculo bacteriano y no al medio de cultivo semisólido de las placas como en estudios anteriores (Figura 25). Esto se hizo con el objetivo de comparar el efecto de este inhibidor con el de la lactonasa de AHL Aii20J cuya limitación en concentración no permitió su incorporación al agar en placa. En cualquier caso, estos resultados indican un mayor potencial en el control de motilidad de *Acinetobacter* mediante estrategias de bloqueo de QS que las directamente implicadas en inhibición de formación de pili. Los resultados de este estudio demuestran, que al añadir virstatina al medio de cultivo de *A. baumannii* ATCC17978, la producción de AHLs no se ve afectada (Figura 26) descartando por tanto un efecto de esta molécula sobre la síntesis de estas señales, al menos en las condiciones ensayadas. En un estudio previo con los aislados clínicos de *A. baumannii* estudiados a lo largo de este trabajo, se encontró, de entre varios genes relacionados con la motilidad y la virulencia de *Acinetobacter* spp., una correlación positiva entre la sobre-expresión del gen *pilT* y el QS así como su asociación con la motilidad en superficie, como resultado del decrecimiento de sus niveles de expresión al añadir al cultivo la lactonasa Aii20J en condiciones donde la enzima Aii20J inhibió la motilidad (López et al. 2017). Como ya se ha descrito previamente, el requerimiento de pili de tipo IV en la motilidad asociada a superficie es controvertido, ya que otros autores observan que el pili tipo IV (entre ellos *pilT*) no es necesario para la motilidad asociada a superficie (Harding et al. 2013).

No obstante, bajo las condiciones realizadas en este estudio, solo se obtuvo una mínima amplificación de *pilT* en las condiciones de cultivo propicias para la producción de AHLs en ATCC17978 y del resto de los reguladores y genes relacionados con la motilidad, no se pudo establecer ninguna relación con las condiciones que permiten la producción de AHLs. Sería necesario realizar un análisis de la expresión de todos estos genes a lo largo de la curva de crecimiento de *A. baumannii* ATCC17978, para determinar cómo varía la expresión en relación con el tiempo y en cada condición de cultivo, así como cuantificar los niveles de expresión de estos genes en las placas de

motilidad, para poder correlacionarlos con la producción del perfil de señales de QS encontrado.

En resumen, en este capítulo demostramos que *A. baumannii* ATC17978 produce AHLs solamente en condiciones estáticas, indicando una posible relación entre las condiciones que promoverían la adherencia celular y la producción de señales de QS en este patógeno. Del mismo modo, demostramos que el QS está involucrado en la producción de motilidad asociada a superficie de esta especie, a diferencia de M2, al menos en las condiciones probadas, y que inhibidores de QS, como la enzima de QQ Aii20J, podrían utilizarse para el control de este fenotipo de virulencia.



CAPÍTULO 2. Quorum quenching en *A. baumannii*.

Antecedentes

Los resultados del capítulo 1 indicaron la posible existencia de actividad QQ como moduladora de la producción de AHLs en *A. baumannii* ATCC17978 así como en *A. nosocomialis* M2, que explicaría el descenso de la concentración de AHLs en fase estacionaria incluso en condiciones de pH controlado. La presencia de QS y QQ en una misma bacteria ya ha sido mencionada en la literatura, como *Agrobacterium tumefaciens*, que produce OC8-HSL (oxooctanoil homoserín lactona) a la vez que contiene dos lactonasas degradadoras de AHLs, AiiB y AttM, actuando esta última contra OC8-HSL cuando es activada por señales de inanición (Zhang et al. 2002, Uroz et al. 2009). Corroborando esta hipótesis, durante la realización de este trabajo se ha descrito gracias a estudios de transcriptómica, la existencia de una enzima perteneciente a la familia de las α/β hidrolasas con actividad QQ en varios aislados de *A. baumannii*, que se sobre-expresa al añadir OC12-HSL (oxododecanoil homoserín lactona) a los cultivos de manera exógena (López et al. 2017), aunque ésta no es la señal mayoritaria de *A. baumannii* como demostramos en el capítulo anterior. Adicionalmente, en ese estudio se sugiere una asociación entre la presencia de AidA y la ausencia de motilidad asociada a superficie mediada por AHLs (López et al. 2017). Además de AidA, solo se han descrito dos enzimas con actividad QQ demostrada en el género *Acinetobacter*. Una de ellas es AmiE, con actividad de tipo acilasa en *Acinetobacter* sp. Ooi24, una cepa aislada del lodo activado de una planta de tratamiento de residuos que presenta actividad QQ contra AHLs de cadena larga (Ochiai et al. 2014), y la otra es AidE con actividad de tipo lactonasa en *Acinetobacter* sp. 77 (Liu et al. 2017).

Además de estas 3 enzimas con actividad QQ comprobada, existen varios estudios en la bibliografía que demuestran la presencia de actividad QQ en aislados ambientales del género *Acinetobacter*, siendo capaces de degradar distintas AHLs, aunque sin identificar las enzimas responsables de su actividad. *Acinetobacter* sp. C1010, aislada del suelo, es capaz de degradar C6-HSL (hexanoil homoserín lactona) y C8-HSL (octadecanoil homoserín lactona), mediante la acción de una enzima que aún está sin identificar (Kang et al. 2004). En *Acinetobacter* sp. GG2, una cepa asociada a la rizosfera de jengibre (*Zingiber officinale*), también se demostró la coexistencia de QS y QQ mediante lactonólisis de las AHLs (Chan et al. 2011). Distintos autores describieron distintas secuencias con posible actividad QQ en este género, como la enzima intracelular de *Acinetobacter* sp. HMS-1, una cepa aislada de aguas residuales (Kim et al. 2014). En el genoma de la cepa *A. baumannii* A155 se encontraron dos secuencias que codificarían dos enzimas putativas de tipo lactonasa, la Y2-AiiA y la YtnP (Arivett et al. 2015), coincidiendo esta última por homología de secuencia con las presuntas lactonasas de AHLs de los genomas de la cepa multirresistente a antibióticos *A. baumannii* AYE, de la cepa sensible a antibióticos *A. baumannii* SDF y de la especie ambiental *Acinetobacter baylyi*, que se identificaron como candidatas en una búsqueda de enzimas de QQ en estas cepas/especies (Vallenet et al. 2008). Otros autores describieron una secuencia de lactonasa putativa de AHLs en *Acinetobacter* sp. DR1 (Kang y Park 2010a), que se corresponde a su vez, con la Y2-AiiA de *A. baumannii* A155. Al comenzar este capítulo, desconocíamos la existencia de QQ en *A. baumannii* ATCC17978, por lo que se decidió investigar la presencia de QQ en esta especie con la hipótesis de que la degradación enzimática de señales de QS podría ser la causa de la caída de la concentración de OHC12-HSL observada en el primer capítulo. Debido a la existencia de referencias de múltiples enzimas con esta actividad en el género y a que

una revisión de los análisis de la capacidad QQ de los aislados clínicos publicados por López et al. (2017) reveló la existencia de actividad QQ en el aislado clínico de *A. baumannii* Ab7, que carece de la secuencia AidA, al igual que *A. nosocomialis* M2, se consideró la hipótesis de la posible existencia de más de una enzima degradadora de AHLs en *A. baumannii*, por lo que el objetivo de este capítulo fue analizar y caracterizar la capacidad de degradación de señales de QS en *A. baumannii* ATCC17978 e investigar la existencia de diversas enzimas responsables de dicha actividad.



Resultados

1. QQ en *A. baumannii* ATCC17978 y en *A. nosocomialis* M2

En primer lugar, se investigó si *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y los mutantes respectivos de la sintasa de AHLs *abaI* tenían actividad QQ, además del mutante $\Delta adeB$ de ATCC17978, realizando un bioensayo de inhibición de activación de violaceína usando células vivas.

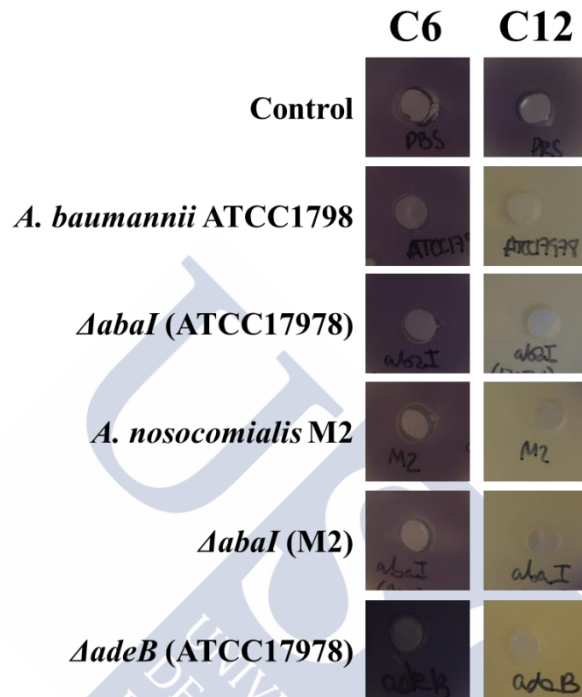


Figura 32. Capacidad de degradación de las señales C6 y C12-HSL por células vivas de *A. baumannii* ATCC17978, de *A. nosocomialis* M2, de sus respectivos mutantes de la sintasa de AHLs *abaI* ($\Delta abaI$) y del mutante $\Delta adeB$ de *A. baumannii* ATCC17978, medida mediante bioensayo de inhibición de producción de violaceína. Las señales (10 μ M) se expusieron durante 24 horas a la acción de células vivas procedentes de cultivos en fase estacionaria (24 horas), en agitación. Como control negativo se utilizó PBS 6,7 pH con la misma concentración de cada señal.

Ambas especies fueron capaces de degradar la señal de C12-HSL en célula viva al igual que los mutantes de las sintasas, indicando que la mutación en las sintasas no influye en la capacidad de degradar AHLs de *Acinetobacter*. Sin embargo, ninguna cepa/especie fue capaz de degradar C6-HSL (Figura 32), revelando una actividad de QQ específica para AHLs de cadena larga. El mutante del componente principal de la bomba AdeABC ($\Delta adeB$) también presentó actividad QQ contra C12-HSL, indicando que la mutación de la bomba no interfiere en la capacidad de degradación de AHLs en este patógeno. Es importante reseñar que las células se produjeron en agitación, aunque no podemos concluir que la actividad QQ esté presente en cultivos agitados ya que podrían expresarse durante las 24 h del ensayo de degradación.

Adicionalmente, se evaluó la actividad QQ contra C6 y C12-HSL en célula viva del resto de los aislados clínicos de *A. baumannii* y de *A. calcoaceticus* (AC3) (Figura 33). Tras 24 h de exposición de las señales, todos los aislados clínicos de *A. baumannii* y *A. calcoaceticus* presentaron actividad QQ contra la señal de cadena larga al igual que *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2. En cuanto a la señal de cadena corta, ninguna especie/aislado fue capaz de inhibir la producción de violaceína.

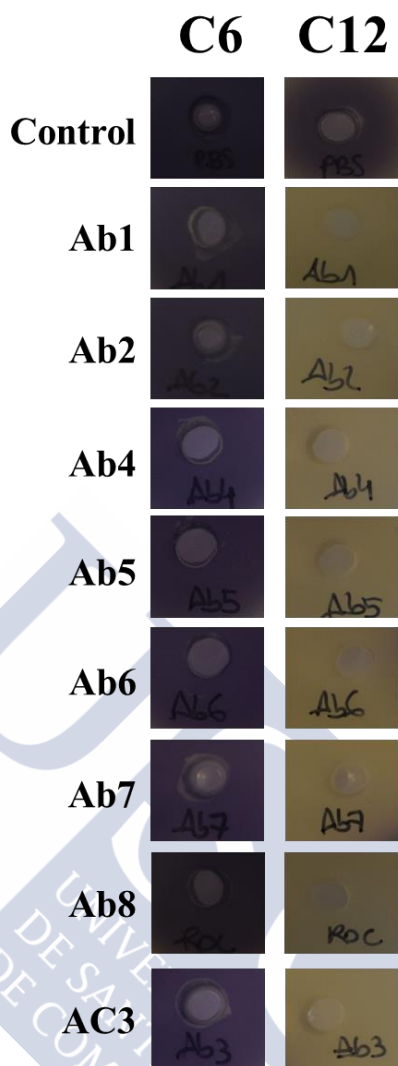


Figura 33. Actividad QQ contra las señales C6 y C12-HSL (10 μ M) de las células vivas de los aislados clínicos de *A. baumannii* Ab1, Ab2, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7 y Ab8 y del aislado de *A. calcoaceticus* (AC3), medida mediante bioensayo de inhibición de violaceína en medio sólido tras 24 h con las señales con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 respectivamente. El PBS mezclado con la señal correspondiente se usó como control negativo.

Una vez confirmada la existencia de actividad QQ en célula viva de *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y de los mutantes respectivos de las sintasas de AHLs, decidimos analizar en mayor profundidad si esta actividad QQ podría ser la responsable del brusco descenso de la producción de AHLs en este patógeno observado en el capítulo 1, determinando si la actividad QQ se modificaba a lo largo de la curva de crecimiento. En primer lugar, se realizaron extractos celulares de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 a partir de 5 mL de los cultivos estáticos utilizados para las cinéticas de producción de AHLs de ambas especies en el capítulo anterior (Figura 8), recogidos a distintas horas de la curva de crecimiento (6, 12, 17, 24, 36 y 48 h) en medio LB y en el medio LB tamponado con PIPES (200 mM, pH 6,0) para prevenir la posible lactonólisis espontánea de las señales (Yates et al. 2002). Los extractos se prepararon en un volumen de PBS (pH 6,7) igual al volumen de cultivo centrifugado. Se analizó la capacidad de degradación de los extractos de ambas especies en un ensayo de inhibición de producción de violaceína contra las señales C6 y

C12-HSL con los biosensores de *Chromobacterium violaceum* CV026 y VIR07, respectivamente.

Con el objetivo de poder detectar la posible presencia de actividad QQ en las muestras obtenidas al principio de la curva de crecimiento, mucho menos concentradas, se prepararon extractos más concentrados a partir de 50 mL de cultivo resuspendidos en 1,5 mL de PBS (pH 6,7), recogidos en los mismos tiempos de la curva de crecimiento, en los cuales se analizó la actividad QQ contra la señal AHL de cadena larga (Figura 34).

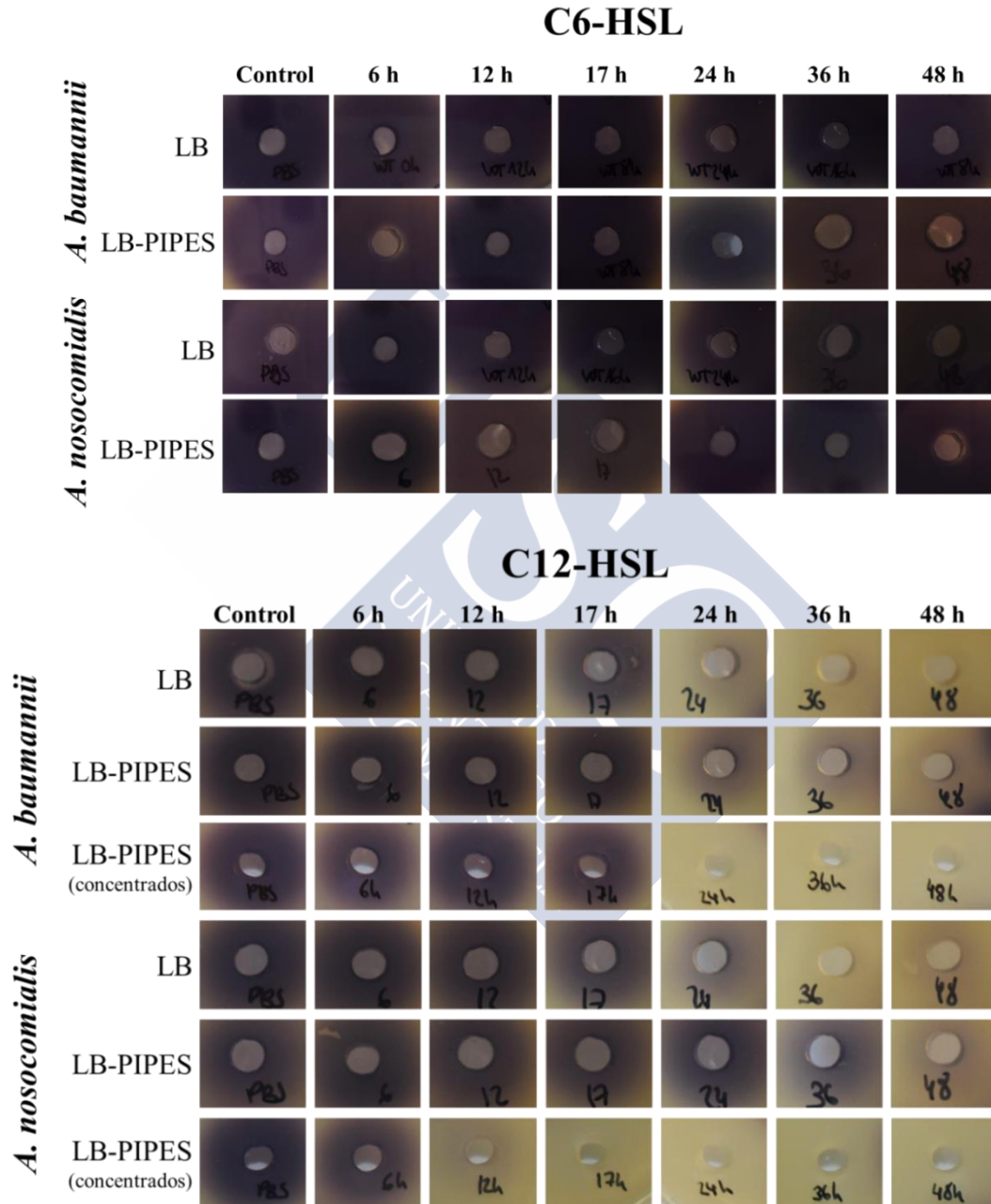


Figura 34. Actividad de degradación de las AHLs C6 y C12-HSL (10 μ M) en los extractos celulares cultivados en LB o en LB con pH controlado con tampón PIPES (LB-PIPES) (200 mM, pH 6,0) de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 recogidos a distintos tiempos de la curva de crecimiento (6, 12, 17, 24, 36 y 48 h) en cultivos estáticos, medida mediante bioensayo con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 respectivamente. Las señales se expusieron a los extractos durante 24 h. Además, para C12-HSL se muestra la actividad presente en extractos concentrados en LB con pH controlado -LB-PIPES (concentrados)-. Los pocillos de los extractos con actividad QQ presentan ausencia del pigmento

violaceína debido a la degradación de la AHL. Como control negativo se utilizó la AHL en PBS tratada de la misma forma y resultando en la producción de la coloración violeta.

Como muestran los resultados obtenidos, en relación a la AHL de cadena corta, ninguno de los extractos fue capaz de degradar la señal C6-HSL a ningún tiempo de la curva de crecimiento (Figura 34).

Se detectó presencia de actividad QQ en extractos celulares de *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* contra C12-HSL a partir de las 24 h de cultivo en medio LB (Figura 34), siendo capaces de inactivar la señal inductora de la producción de violaceína, corroborando que ambas especies degradan preferiblemente AHLs de cadena larga y que su actividad QQ podría ser responsable de la drástica disminución de la producción de señales de QS en sobrenadantes de ATCC17978 y M2 de cultivos estáticos observada en el anterior capítulo (Figura 8). En condiciones de pH controladas, sin embargo, M2 no presentó actividad QQ antes de las 36 h de crecimiento en contraste con *A. baumannii* ATCC17978, en la cual a partir de las 24 h de cultivo tamponado empezó a degradar la señal (Figura 34). Tal como describimos en el capítulo 1, la producción de la AHL mayoritaria (OHC12-HSL) fue mucho mayor en *A. baumannii* ATCC17978 cuando se controló el pH del medio de cultivo (Figura 8). Sin embargo, en *A. nosocomialis* M2 al controlar el pH las señales de QS identificadas mediante HPLC-MS se produjeron a bajísima concentración (Figura 8), lo que explicaría que en condiciones de pH controladas exprese menos enzimas de degradación de AHLs y en consecuencia, M2 presente menor actividad QQ en pH controlado como observamos en la figura 34.

Los extractos más concentrados permitieron detectar actividad QQ más temprano en M2, en la cual comenzaron a degradar C12-HSL mucho antes en la curva de crecimiento (12 h), indicando que está presente más temprano aunque a menor concentración.

Un segundo experimento, ya centrándonos en la especie de interés *A. baumannii* ATCC17978 y en vista de la gran influencia observada de las condiciones de cultivo sobre la concentración de AHLs en *Acinetobacter* spp. a lo largo del anterior capítulo, también analizamos la actividad QQ de *A. baumannii* ATCC17978 en sobrenadantes filtrados y extractos celulares concentrados a 5X realizados a partir de cultivos agitados y no agitados en el medio de cultivo LB y LB con menor concentración de sal (0,5%) en distintos puntos de la curva de crecimiento. Descartamos la condición del control del pH del medio, ya que a igual concentración de extracto presentaron menos actividad QQ (Figura 34). Como era de esperar, los cultivos no agitados presentaron menor crecimiento inicial que los agitados, entrando en la fase estacionaria a las 17-20 h, frente a los agitados que la alcanzan a las 12 h en ambos medios de cultivo. Todos ellos obtuvieron la misma densidad celular en fase estacionaria y no existieron diferencias de crecimiento entre LB y LB con menor concentración de sal (Figura 35).

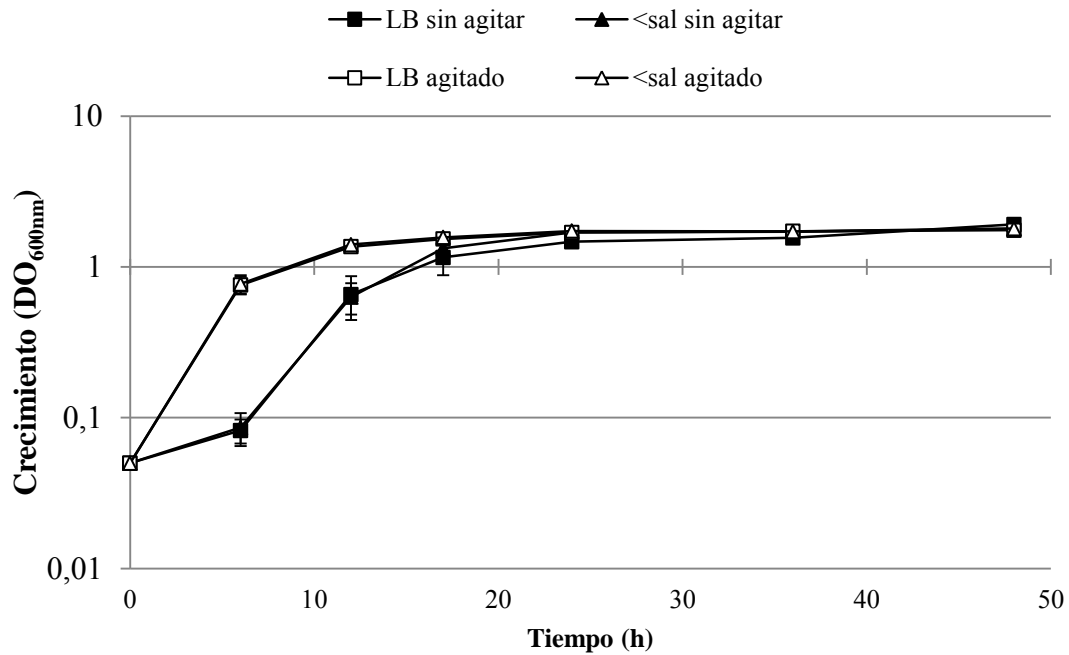


Figura 35. Curvas de crecimiento en cultivos estáticos (en negro) o agitados (en blanco) de *A. baumannii* ATCC17978 en LB (cuadrados) o en LB con baja concentración de sal (0,5%) (triángulos).

Los sobrenadantes filtrados de los cultivos degradaron C6-HSL a partir de las 36 h de crecimiento en cultivos estáticos de LB y LB con baja sal y en cultivos agitados presentaron actividad de degradación más temprano (Figura 36), seguramente porque alcanzan mayor densidad en menos horas de cultivo (Figura 35). Contra la señal C12-HSL, a las 17 h los sobrenadantes ya presentaron actividad en cultivos no agitados y a partir de las 12 h de crecimiento en cultivos agitados (Figura 36), coincidiendo con la fase estacionaria e indicando una preferencia por la señal de cadena larga.

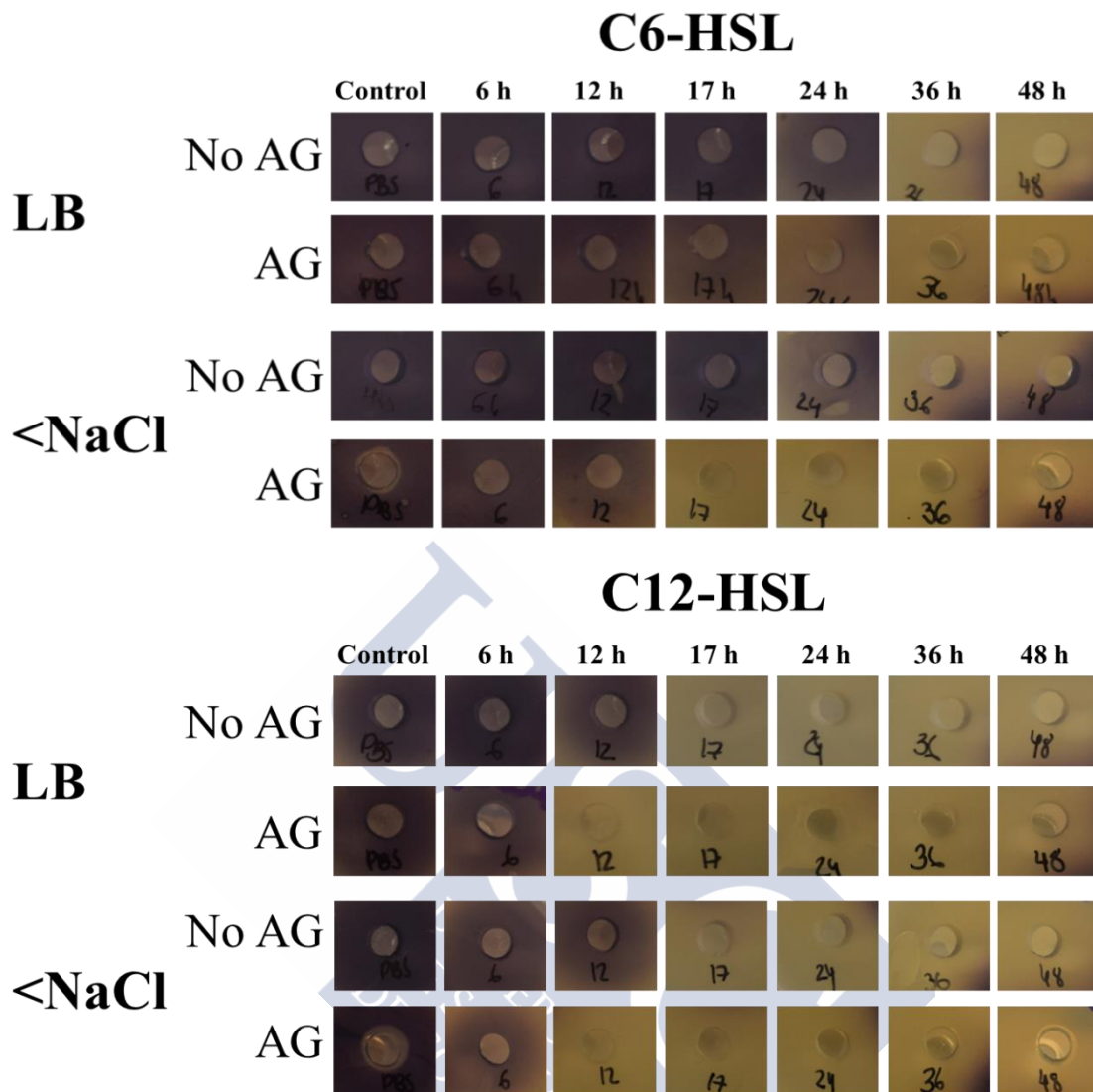


Figura 36. Actividad QQ de los sobrenadantes de *A. baumannii* ATCC17978 recogidos a distintas horas del cultivo en medio LB o LB con menos sal (0,5%) en agitación (AG) o sin agitación (No AG), contra las señales C6 o C12-HSL (10 µM). Tras 24 h de exposición con cada señal se realizó el bioensayo de inhibición de violaceína en placa con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07. Para el control negativo se utilizó PBS 6,7 pH con cada señal.

Además, para poder equiparar la actividad de los extractos en las distintas horas de la curva de crecimiento, la biomasa de los cultivos para la realización de los extractos celulares se ajustó a la misma densidad óptica (600 nm) de 1.

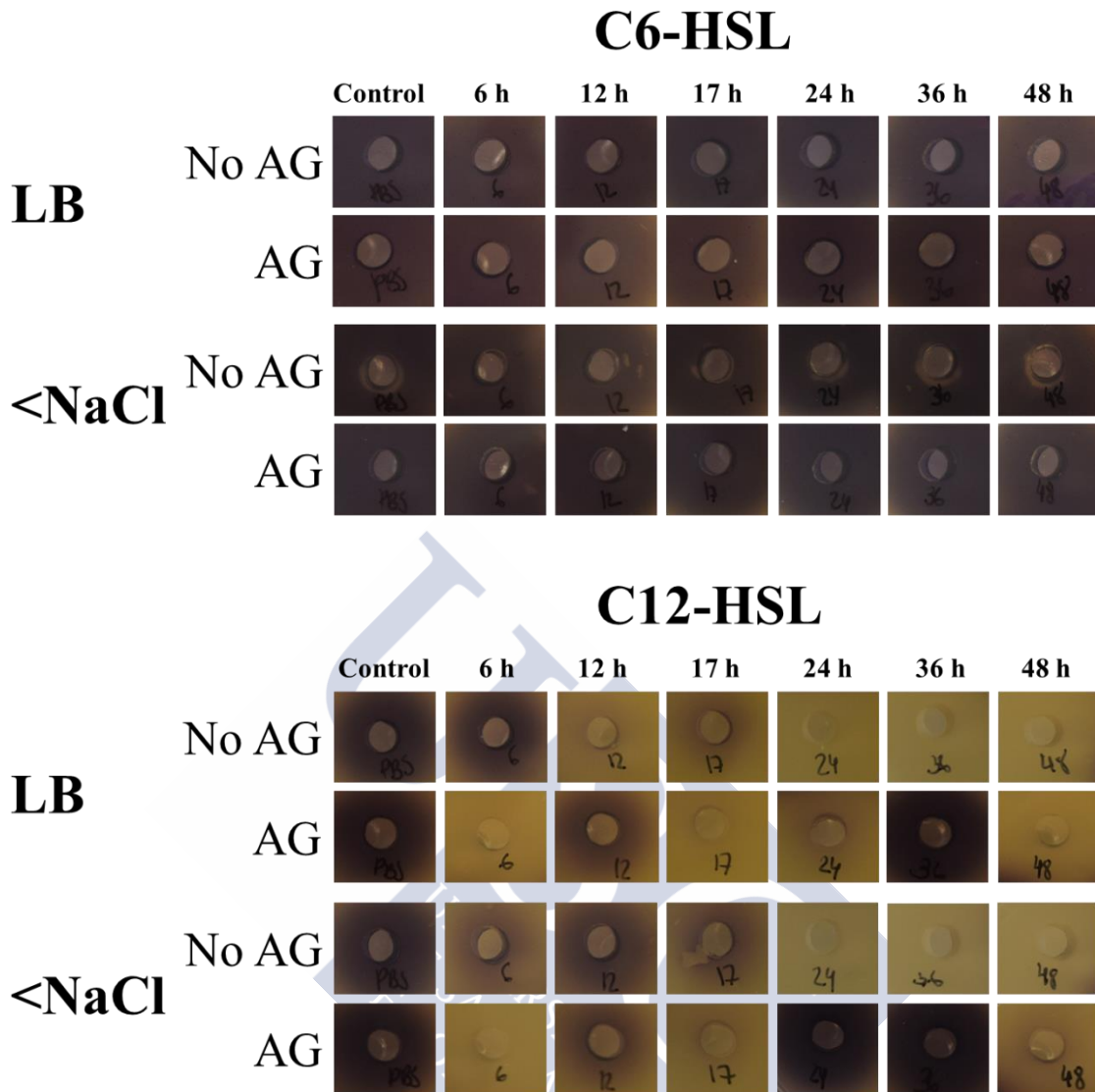


Figura 37. Actividad QQ contra las señales C6 o C12-HSL (10 μ M) de los extractos celulares realizados a partir de biomasa recogida a distintas horas del cultivo de *A. baumannii* ATCC17978 en medio LB o LB con menos sal (0,5%) (<NaCl) en agitación (AG) o sin agitación (No AG). Tras 24 h de exposición con las señales se realizó un bioensayo con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07, respectivamente. La densidad óptica (600 nm) de los extractos fue ajustada a 1. El control con la misma concentración de cada señal se utilizó como control negativo.

Como se muestra en la figura 37, en cuanto a la AHL corta, estos extractos no fueron capaces de degradar la señal C6-HSL en ningún punto del cultivo en estas condiciones, mostrando diferencias con la actividad encontrada en sobrenadante. La presencia de actividad en los sobrenadantes frente a C6-HSL, a diferencia de lo encontrado en la biomasa, indica la presencia de más de un tipo de actividad enzimática en *A. baumannii*.

A. baumannii ATCC17978 presentó QQ contra C12-HSL en condiciones de agitación, y las diferencias con los cultivos estáticos, aunque existen, no justifican que no aparezcan AHLs detectables en agitación, indicando que el QQ, al menos medido mediante esta técnica, es independiente del sistema de QS.

Los extractos de *A. baumannii* ATCC17978 realizados a partir de cultivos no agitados (NO AG) presentaron actividad QQ contra C12-HSL a partir de las 12 h de cultivo en LB y a partir de las 17 h en adelante en medio con baja sal (<NaCl). Cuando

los cultivos se agitaron (AG) la actividad QQ aparece a las 6 h en ambos medios de cultivo, debido a la mayor densidad óptica de los cultivos, sin embargo, a lo largo de la curva la actividad de degradación de AHLs decrece y aumenta en los distintos puntos de la curva de crecimiento. De este modo, en medio LB presenta actividad a las 6, 17, 24 y 48, siendo incapaz de degradar toda la señal en los extractos de 12 y 36 h de cultivo. En baja sal y agitación, ATCC17978 tampoco fue capaz de degradar toda la concentración de C12-HSL a las 24 ni 36 h (Figura 37).

La diferencia de actividad QQ entre extractos y sobrenadantes podría explicarse, además de por la gran influencia de las condiciones de cultivo que afecta a este patógeno, mencionada en el capítulo anterior y a lo largo de este, por la presencia de varios enzimas de QQ en la misma bacteria, de forma que cada uno se exprese de manera diferente según las distintas condiciones de cultivo, actuando a distintos tiempos de la curva, excretándose al exterior de la célula o mostrando actividad intracelular.

Mediante HPLC-MS se confirmó la actividad QQ de *A. baumannii* ATCC17978 en extracto de un cultivo agitado de 17 o 24 h contra las señales C12 y OHC12-HSL y del punto final para C6-HSL (Figura 38).

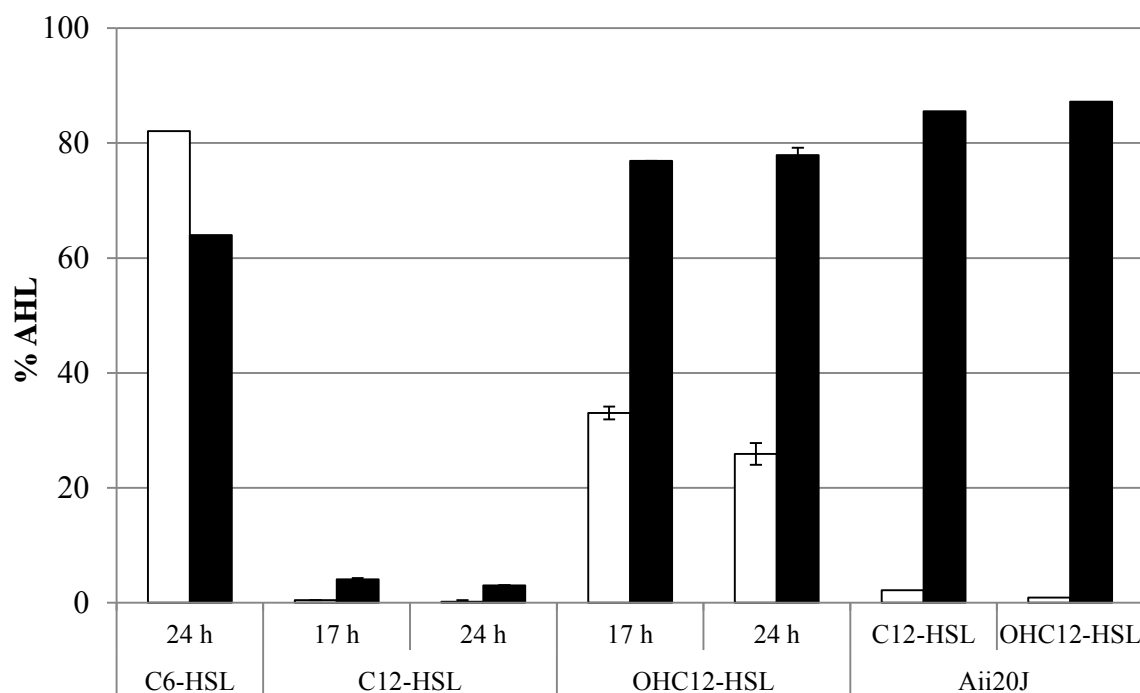


Figura 38. Degradación de C6, C12 y OHC12-HSL ($10 \mu\text{M}$) tras 24 h de exposición con el extracto celular de 17 o 24 h de cultivo en medio LB de *A. baumannii* ATCC17978 (barras blancas) cuantificada mediante HPLC-MS. Se acidificaron alícuotas de las muestras a pH 2 para permitir la recuperación del anillo lactona de las señales (barras negras). Como control negativo se usó el PBS más la señal correspondiente tratado del mismo modo y como control positivo se utilizó la lactonasa Aii20J purificada ($20 \mu\text{g/mL}$). Los datos se representan como el porcentaje de la concentración de señal recuperada en relación al control. Las muestras se realizaron por triplicado, mostrándose la media y la desviación estándar ($n=3$).

El extracto celular fue capaz de degradar casi por completo la señal de C12 ya a las 17 h y el 75% de la señal OHC12-HSL añadida en cultivos de 24 h, mientras que solo eliminó un 20% de C6-HSL, confirmando que la actividad enzimática en *A. baumannii* es específica para AHLs de cadena larga. Para elucidar qué tipo de enzima/s es/son el/los responsable/s de la actividad QQ de *A. baumannii*, las muestras del extracto con las AHLs se acidificaron a pH 2 para permitir la posible recircularización del anillo de

las señales degradadas (Yates et al. 2012). Si la enzima presenta actividad lactonasa contra señales de QS, se esperaría un aumento en la concentración de la AHL tras la acidificación como ocurre con el control de la lactonasa Aii20J (Figura 38). Tras la acidificación de las reacciones se recuperó en gran cantidad la concentración de la señal OHC12-HSL (Figura 38), confirmando la presencia de una lactonasa de AHLs en los extractos de ATCC17978 predominantemente. Sin embargo, la acidificación no permitió recuperar la concentración de C12-HSL, ni de C6-HSL, apoyando de nuevo la posible existencia de varias enzimas de QQ con distinto tipo de actividad enzimática que podría explicar esta diferencia entre la recuperación de las señales. En el caso de C6-HSL, la enzima debe encontrarse en el sobrenadante.

2. Búsqueda de enzimas con actividad QQ en *A. baumannii* ATCC17978

Con el objetivo de identificar qué enzima o enzimas eran las responsables de la actividad QQ de *A. baumannii* ATCC17978, se realizó una búsqueda bioinformática en el genoma de la especie depositado en la base de datos del NCBI (Smith et al. 2007), de secuencias homólogas a una batería de enzimas degradadoras de señales de QS descritas en la bibliografía, tanto de tipo acilasa como lactonasa, utilizando la herramienta *blast* del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

No se encontraron secuencias con altos porcentajes de homología en *A. baumannii* ATCC17978, a pesar de que se utilizaron doce secuencias de acilasas de QQ descritas en la bibliografía (Romero et al. 2015). Tampoco se encontraron en ATCC17978 homólogos a la acilasa AmiE descrita en *Acinetobacter* sp. Ooi24 en *A. baumannii* ATCC17978 (Ochiai et al. 2014), salvo una glutamil-ARNt amidotransferasa (A1S_1865) con un 25% homología que se descartó por presentar una función no relacionada con el QQ.

Sin embargo, en cuanto a las enzimas con actividad lactonasa, que presentan mayor grado de conservación entre ellas, se encontraron varias secuencias homólogas, además de la lactonasa perteneciente a la familia α/β hidrolasa con actividad QQ AidA (A1S_1757) recientemente identificada en varios aislados de *A. baumannii* (López et al. 2017). Para ello, se realizó un alineamiento con todas las lactonasas conocidas descritas hasta ahora con actividad demostrada o putativa (Mayer et al. 2015, Romero et al. 2015), la mayoría englobadas en la superfamilia de las metalo- β -lactamasas que contienen el dominio conservado HXHXDH además de dos sitios de unión a iones metálicos (Dong et al. 2000, Bebrone 2007). En esta búsqueda se incluyó la enzima AiiA de *Bacillus* sp. 240B1 (Dong et al. 2000), representante de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, la lactonasa de QQ putativa YtnP depositada en la base de datos del NCBI en el genoma de *A. baumannii* A155 (Arivett et al. 2015) y la enzima denominada Y2-AiiA depositada en la base de datos del NCBI en el genoma de *A. baumannii* A155 como *N*-acil homoserín lactona (Arivett et al. 2015), la cual no presenta exactamente el dominio conservado de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, sino un dominio conservado de un subgrupo sin caracterizar de la familia de las metalohidrolasas con esqueleto de metalo- β -lactamasas, con un aspartato en lugar de la segunda histidina del dominio conservado (HXDXDH). Además, se realizó una búsqueda de dominios conservados de estas familias de enzimas mediante la herramienta *cd-search* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Tras los distintos alineamientos se encontraron siete secuencias aminoacídicas en *A. baumannii* ATCC17978, aparte de AidA, con posible actividad QQ (Tabla 7), en función de su homología y la presencia del dominio conservado de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas (HXHXDH). Hasta el momento, en ninguna de ellas se ha

demostrado actividad QQ, apareciendo depositadas en la base de datos sin ninguna referencia sobre su posible actividad.

Ninguna de las secuencias encontradas presentó homología con la enzima AidA de *A. baumannii*, como era de esperar, pues AidA pertenece a otra familia distinta de enzimas de QQ. Las enzimas encontradas presentaron entre un 23 y un 30% de homología a nivel de aminoácidos con la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp. 240B1 (Tabla 7). La A1S_2662 se corresponde por homología con la lactonasa putativa de QQ YtnP descrita en la cepa A155 (Arivett et al. 2015) y con una lactonasa candidata de QQ de una cepa multirresistente a drogas *A. baumannii* AYE, estando presente también en una cepa sensible a antibióticos, *A. baumannii* SDF, así como en una cepa ambiental, *A. baylyi* ADP1 (Vallenet et al. 2008) (Figura 39A). Además, A1S_2662 comparte un 24% de homología con la lactonasa putativa Y2-AiiA de *A. baumannii* A155 depositada en el NCBI (Arivett et al. 2015), ambas con un porcentaje alto de cobertura (Tabla 7). La A1S_2864 se corresponde por homología con la lactonasa putativa Y2-AiiA depositada en la base de datos del NCBI en el genoma de *A. baumannii* A155 (Arivett et al. 2015), y a su vez, con la descrita como lactonasa putativa de AHLs en *Acinetobacter* sp. DR1 en un trabajo de Kang y Park (2010a).

Todas las lactonasas encontradas presentaron el dominio característico de unión a zinc de la de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas (HXHXDH), salvo la A1S_2864, que contiene el dominio conservado con aspartato en lugar de histidina (HXDXDH) del subgrupo sin caracterizar de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas (Figura 39B).



2. Quorum quenching en *A. baumannii*

Tabla 7. Secuencias homólogas a enzimas de QQ de tipo lactonasa encontradas en el genoma de *A. baumannii* ATCC17978. Se muestra el porcentaje de homología y el de cobertura de cada una de ellas con la secuencia de la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp. 240B1 (Dong et al. 2000), y con las lactonasas putativas YtnP y Y2-AiiA de *A. baumannii* A155 (Arivett et al. 2015). En negrita aparecen remarcaadas las proteínas con mayores homologías de secuencia aminoacídica. Las secuencias que se corresponden con las lactonasas putativas ya descritas aparecen subrayadas en gris.

Proteína	Nº acceso	Descripción de la secuencia en el NCBI	ID (%) AiiA	Cobertura (%) AiiA	ID (%) Y2-AiiA	Cobertura (%) Y2-AiiA	ID (%) YtnP	Cobertura (%) YtnP
AIS_0383*	ABO10842.2	A Hypothetical protein	30	42	23	49	24	71
AIS_1708	ABO12135.1	B Beta-lactamase-like protein	23	39	26	13	43	14
AIS_1876*	ABO12303.2	C Putative metallo-beta lactamase	23	65	46	34	50	11
AIS_2194	ABO12621.2	D Putative hydroxyacylglutathione hydrolase	29	39	25	49	26	39
AIS_2270	ABO12693.2	E Metal-dependent hydrolase of the beta-lactamase superfamily III	39	9	29	24	23	35
AIS_2662*	ABO13078.2	F Putative hydrolase	24	66	24	83	99	100
AIS_2864	ABO13270.2	G Hypothetical protein	26	51	98	66	30	20

ID: homología con la secuencia

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*

*: proteínas con actividad QQ demostrada en este trabajo.

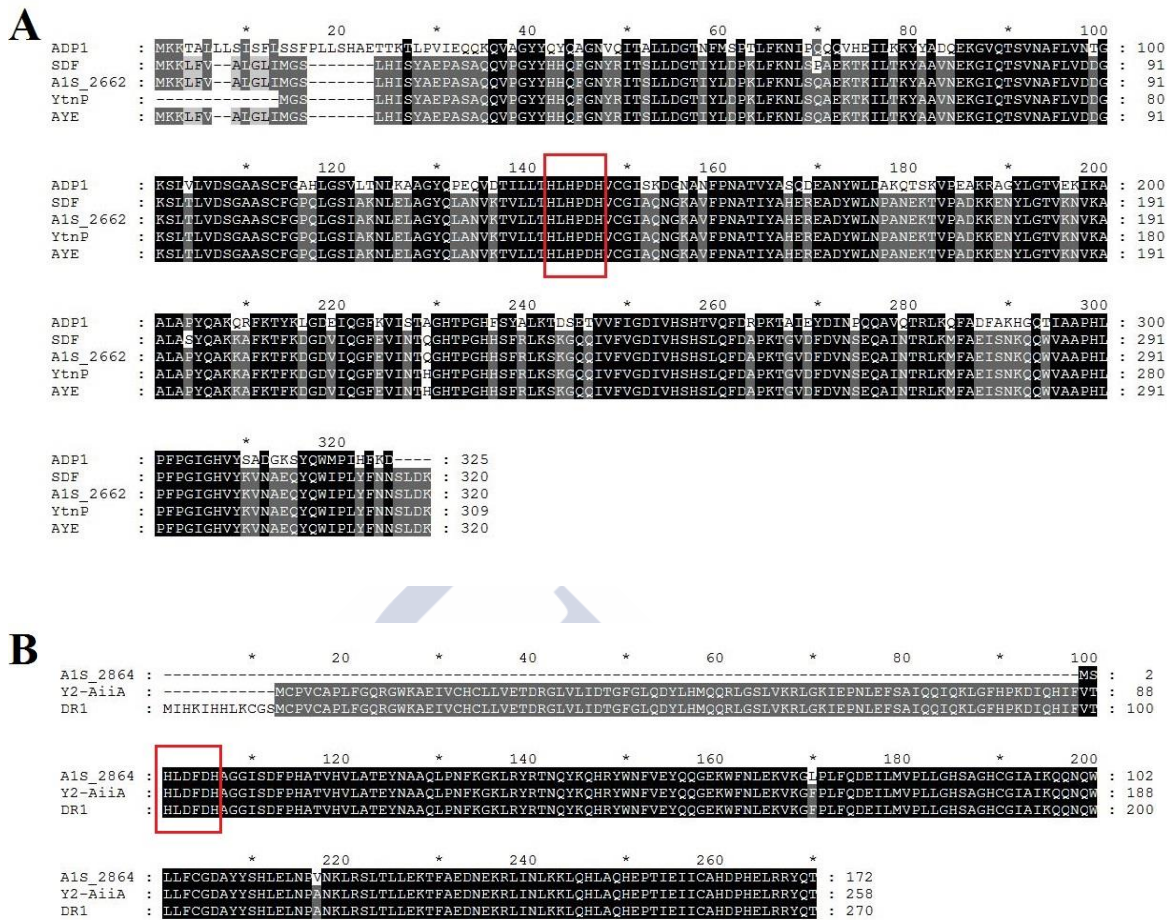


Figura 39. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de enzimas de QQ putativas encontradas que se corresponden con alguna descrita o depositada en la bibliografía. **A)** A1S_2662 de *A. baumannii* ATCC17978 con la lactonasa de QQ putativa YtnP (YtnP) de *A. baumannii* A155 (Arivett et al. 2015, número de acceso KIQ73938.1), y con las presuntas lactonasas de AHLs de *A. baumannii* AYE (AYE), de *A. baumannii* SDF (SDF) y de *A. baylyi* ADP1 (ADP1) (Vallenet et al. 2008, números de acceso CAM85778.1, CAP00187.1 y CAG67670.1, respectivamente). **B)** A1S_2864 de *A. baumannii* ATCC17978 con la N-acil homoserín lactonasa putativa Y2-AiiA de *A. baumannii* A155 (Y2-AiiA) (Arivett et al. 2015, KIQ72097.1), y con la lactonasa putativa de AHLs de *Acinetobacter* sp. DR1 (Kang y Park 2010a, CAM85585.1). Las secuencias se alinearon usando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y se sombrearon con el programa GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Los residuos idénticos y similares se muestran en negro y gris oscuro, respectivamente. Y el motivo conservado de la superfamilia de las metalo-β-lactamasas aparece enmarcado en rojo.

No podemos descartar que existan además otras secuencias diferentes a las conocidas, como ocurre con la lactonasa AidA recientemente identificada en varios aislados de *A. baumannii* mediante estudios de transcriptómica (López et al. 2017), que no presenta homología con otras enzimas de QQ descritas hasta el momento.

3. Clonación y sobre-expresión de los genes responsables de la actividad QQ de *A. baumannii*

3.1. Clonación y sobre-expresión de las secuencias de interés

Para analizar si estas enzimas encontradas mediante análisis informáticos eran realmente enzimas de QQ decidimos clonarlas y sobre-expresarlas en *E. coli*. De las encontradas, seleccionamos solo seis, descartando la A1S_2270 por criterios de baja

homología (Tabla 7). Además, se clonó y sobre-expresó AidA para comparar la actividad QQ. Se amplificaron las secuencias nucleotídicas de cada una de ellas mediante PCR a partir del ADN extraído de *A. baumannii* ATCC17978 con cebadores diseñados específicamente para los extremos de cada secuencia. Como resultado de estas PCRs se obtuvieron fragmentos para todas las secuencias seleccionadas excepto para la A1S_2194 que no amplificó incluso modificando la temperatura de anillamiento. Mediante electroforesis en gel de agarosa se comprobó la amplificación de los fragmentos con el tamaño esperado de cada uno, de los cinco fragmentos obtenidos (A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2662 y A1S_2864), además de AidA. Las secuencias de los genes y de las proteínas que codifican se incluyen en el ANEXO I.

Los fragmentos amplificados se insertaron y ligaron en el plásmido pET28c(+) que añade una cola de poli-histidina al extremo C-terminal en este caso, para facilitar su purificación mediante columnas de afinidad a histidina. Posteriormente, se transformaron células de *E. coli* XL1blue mediante electroporación con la construcción del vector con cada inserto de interés. Se obtuvieron colonias recombinantes de tres de las cinco secuencias amplificadas, además de AidA, ya que A1S_1708 y A1S_2864 no se consiguieron ligar al plásmido o transformar en *E. coli*. Con las tres secuencias clonadas se realizó una primera comprobación mediante PCR y los pares de cebadores correspondientes para asegurarnos de que la construcción del plásmido con cada inserto era correcta. A continuación se extrajo el ADN plasmídico con cada inserto y se realizó una segunda amplificación control con los cebadores específicos del vector pET28c(+) T7Fwd y T7Rev (Figura 40) que se envió a secuenciar utilizando estos mismos cebadores para comprobar que la secuencia de cada gen estuviera en la correcta pauta de lectura con la cola de poli-histidina del plásmido.

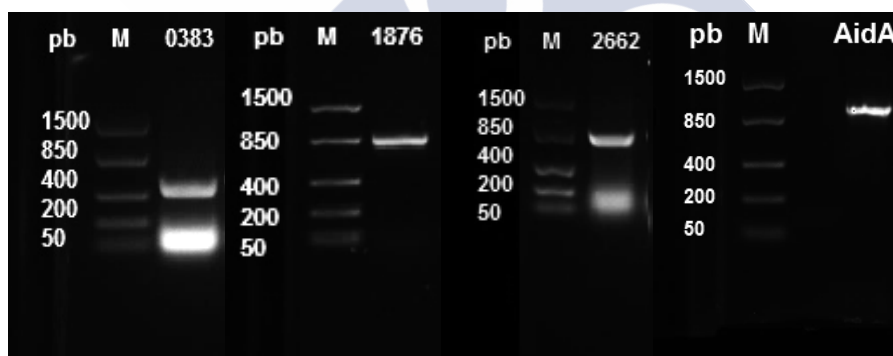


Figura 40. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular (pb). La siguientes calle se corresponde con la PCR de una de las colonias recombinantes obtenidas por electroporación en *E. coli* XL1blue transformado con pET28c(+)-*a1s_0383*, pET28c(+)-*a1s_1876*, pET28c(+)-*a1s_2662* y pET28c(+)-*aidA* con los cebadores T7Fwd y T7Rev del plásmido. Los insertos de cada gen de las lactonas aparecen en el tamaño correspondiente: 645, 867, 963 y 915 pb, respectivamente.

Las secuencias nucleotídicas resultado de la secuenciación se ensamblaron con el software de Lasergene y se tradujeron con la herramienta informática *Protein translate* de ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) eligiendo el marco de lectura adecuado y confirmando que se obtenía la misma secuencia aminoacídica. Por último la construcción correcta del plásmido con los distintos insertos se electroporó en células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3)plysS obteniéndose colonias recombinantes de las tres proteínas nuevas identificadas, además de AidA.

3.2. Caracterización de la actividad QQ de las secuencias de interés

Una vez obtenidas las proteínas en *E. coli* BL21(DE3)plysS se determinó si los distintos clones tenían actividad QQ mediante bioensayo de producción de violaceína con célula viva. Las células vivas de *E. coli* con las tres proteínas sobre-expresadas, además de Aida, fueron capaces de degradar AHLs de cadena larga (C12-HSL) tras 24 h de exposición de la señal tras inducir su expresión añadiendo el inductor IPTG (1 mM) a los cultivos de LB con kanamicina (30 µg/mL) (Figura 41), demostrando su actividad QQ. También fueron capaces de degradar la señal corta (C6-HSL) en las mismas condiciones (Figura 41). Las células de *E. coli* transformado con Aida presentaron actividad QQ solamente contra la señal larga (Figura 41).

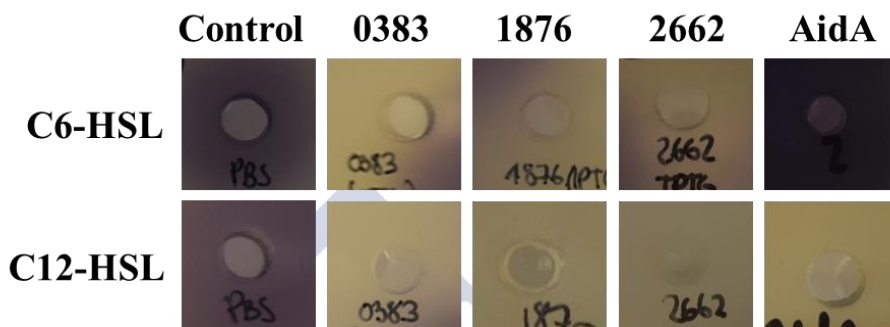


Figura 41. Degradación de AHLs por células vivas de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con las lactonasas A1S_0383, A1S_1876, A1S_2662 y Aida de *A. baumannii* ATCC17978 subclonadas en el plásmido pET28c(+) e inducidas con IPTG (1 mM), medida mediante bioensayo en medio sólido tras 24 h de exposición con C6 y C12-HSL (10 µM) con los biosensores de *C. violaceum* CV026 y VIR07, respectivamente. Los controles negativos de PBS con la AHL correspondiente a la misma concentración muestran el halo pigmentado de violaceína.

A continuación se realizaron extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con las distintas enzimas para determinar la concentración mínima activa necesaria para eliminar completamente una concentración de AHL de 10 µM en un periodo de tiempo determinado. Para ello se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) en PBS pH 6,7 de cada extracto celular de concentración proteica conocida y se realizó un bioensayo de inhibición de producción de violaceína en medio sólido para las dos señales C6 y C12-HSL a 24 h (Figura 42).

La concentración mínima activa del extracto celular de A1S_0383 para C12-HSL fue 50 µg/mL para el tiempo de incubación 24 h. Sin embargo, para C6-HSL solo fue capaz de degradar débilmente la señal en comparación con el control a 500 µg/mL (Figura 42). A diferencia de la célula viva, el extracto celular de *E. coli* transformado con A1S_1876 no fue capaz de degradar ninguna señal ni siquiera en el extracto sin diluir (1,5 mg/mL) (Figura 42). Esto podría explicarse debido a que haya menor proporción de esta proteína expresada en este extracto respecto a la proteína total del mismo, por lo que decidimos continuar con esta enzima por si al purificarla presentaba actividad QQ. Para el extracto celular de A1S_2662 se estableció que la concentración mínima activa a 24 h para C6-HSL fue 500 µg/mL y un orden de magnitud menor para la señal de cadena larga, 50 µg/mL (Figura 42). Para Aida, que no fue capaz de degradar C6-HSL al igual que en célula viva, la concentración mínima activa para C12-HSL fue 50 µg/mL.

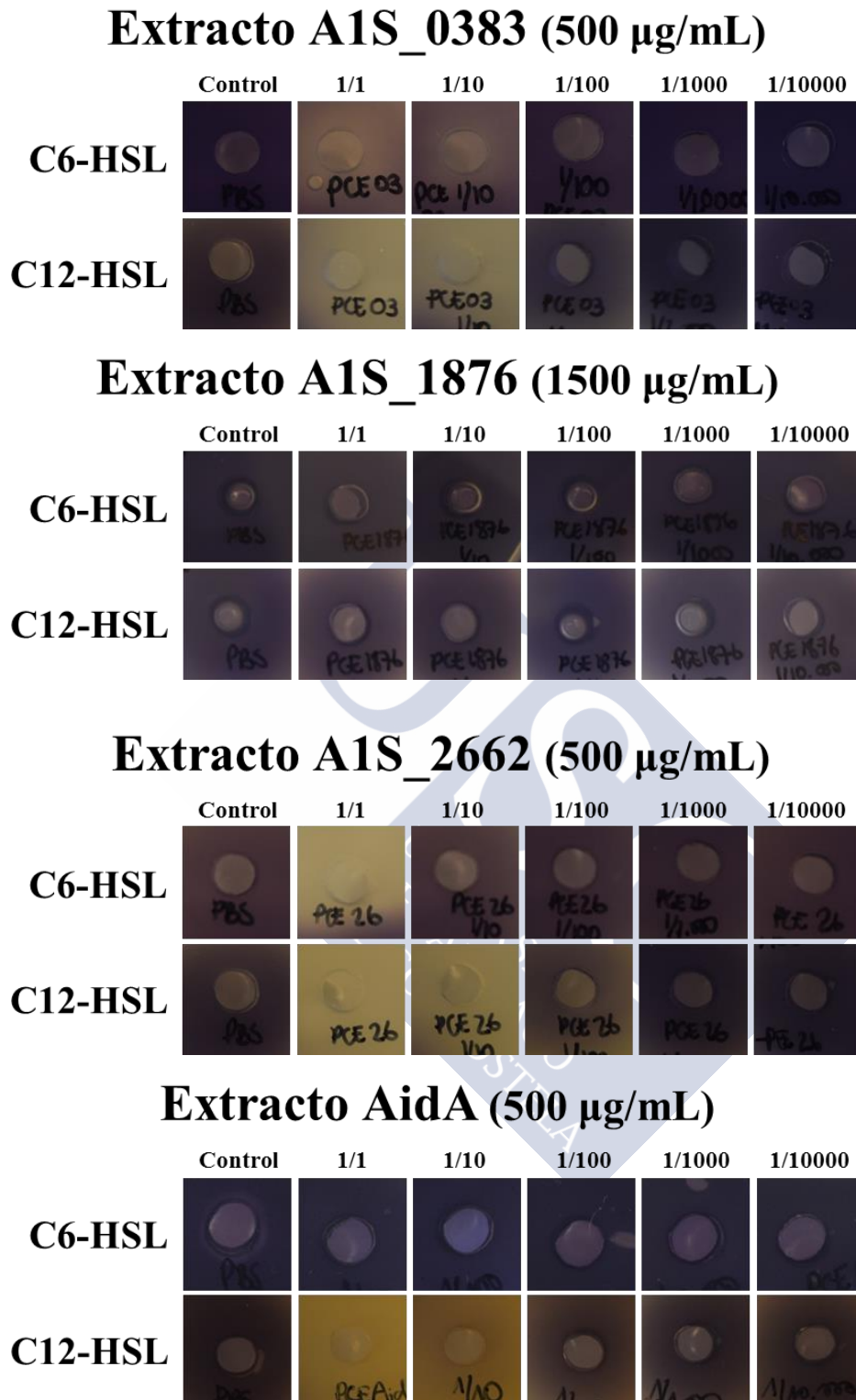


Figura 42. Concentración mínima activa a 24 h contra C6 y C12-HSL (10 µM) mediante bioensayo de inhibición de producción de violaceína en medio sólido de los extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con A1S_0383, A1S_1876, A1S_2662 y AidA con los biosensores de *C. violaceum* CV026 y VIR07. Se incubaron distintas diluciones de un extracto celular de *E. coli* transformado con pET28c(+)-*a1s_0383*, pET28c(+)-*a1s_1876*, pET28c(+)-*a1s_2662* o pET28c(+)-*aidA* de concentración 500 µg/mL, 1,5 mg/mL, 500 µg/mL y 500 µg/mL, respectivamente, con las AHLs durante 24 h. La concentración mínima activa se consideró la concentración de la mayor dilución que logró eliminar por completo la AHL (ausencia de halo de violaceína) en el tiempo estipulado.

3.3. Purificación

Se decidió purificar las tres enzimas ya que mostraron todas actividad QQ en células viva de *E. coli* transformadas con cada una de ellas, además de la α/β hidrolasa AidA (Figura 43). Antes de proseguir con la purificación de la proteína se realizó una prueba de purificación para comprobar que no formaban cuerpos de inclusión en *E. coli* dificultando el proceso. Para ello se preparó un cultivo de 50 mL de LB con kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C, 170 rpm, a partir de una colonia de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con cada uno de los tres genes hasta alcanzar la densidad óptica de entre 0,6 y 1 DO₆₀₀ nm. Se indujo con 1 mM de IPTG la sobre-expresión de la enzima de interés y se mantuvo el cultivo a 16°C durante otras 5 h. Tras centrifugar el pellet a 9000 rpm, 10 min, se resuspendió en 20 mL de PBS pH 6,7, se sonicó durante media hora y la mitad de la muestra se centrifugó. Finalmente se realizó una electroforesis de los sobrenadantes resultantes filtrados y de las muestras sin centrifugar (Figura 43).

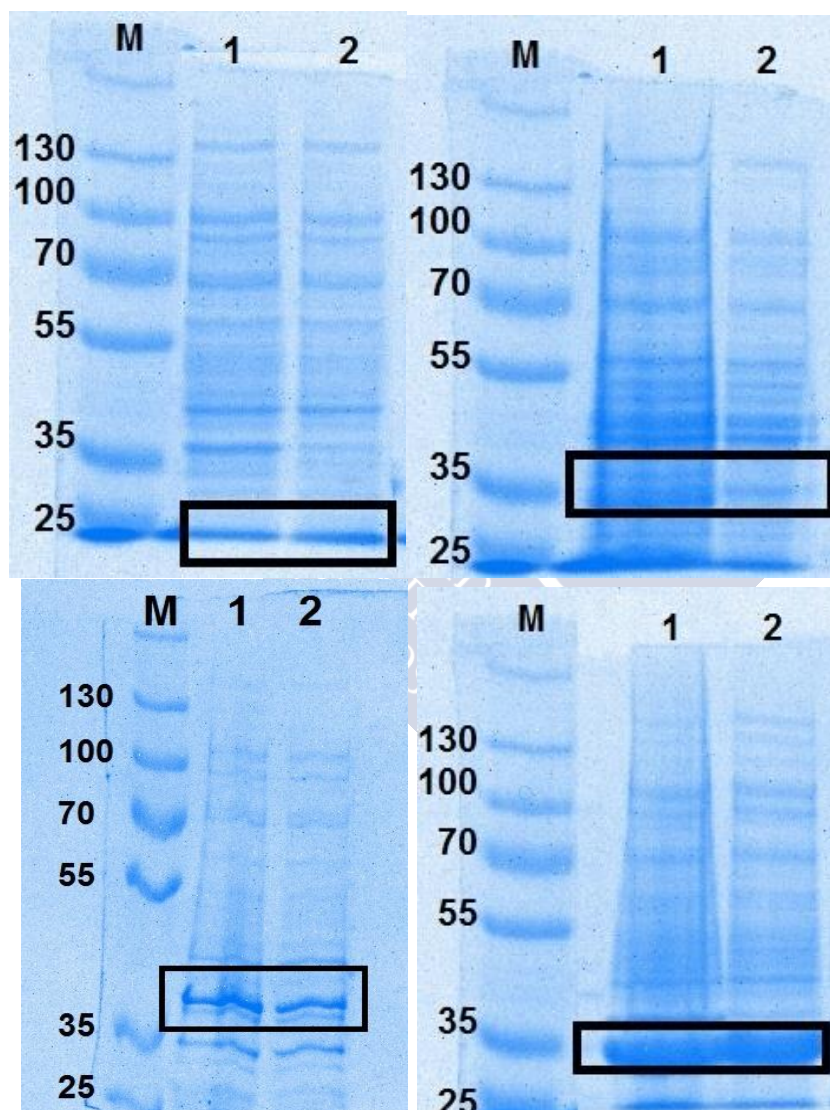


Figura 43. Gel de electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de coomasie del extracto celular de cultivos de 24 h de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado, con pET28c(+)-*a1s0383* (arriba izquierda), pET28c(+)-*a1s1876* (arriba derecha), pET28c(+)-*a1s_2662* (abajo izquierda) y pET28c(+)-*aidA* (abajo derecha). Calle 1: muestra del extracto de la proteína sin centrifugar; calle 2: extracto centrifugado y filtrado (sobrenadante). Las bandas de las proteínas correspondientes aparecen enmarcadas en el recuadro. El marcador molecular (en kDa) se muestra en la calle de la izquierda.

Como se observa en la electroforesis de la figura 43, las proteínas no forman cuerpos de inclusión ya que al centrifugar no se pierden las bandas correspondientes al encontrarse disueltas en el sobrenadante.

Una vez realizada esta prueba se procedió a la purificación de las proteínas en las mismas condiciones, preparando un cultivo de 50 mL de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con el plásmido pET28c(+)-*als_0383*, pET28c(+)-*als_1876*, pET28c(+)-*als_2662* o pET28c(+)-*aidA*. Cada cultivo se centrifugó, se resuspendió en 20 mL de PBS, se sonicó durante media hora en hielo y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante de cada lactonasa se purificó mediante columnas de afinidad por histidina (His GraviTrap™ affinity column, GE Healthcare) según las instrucciones indicadas por el fabricante.

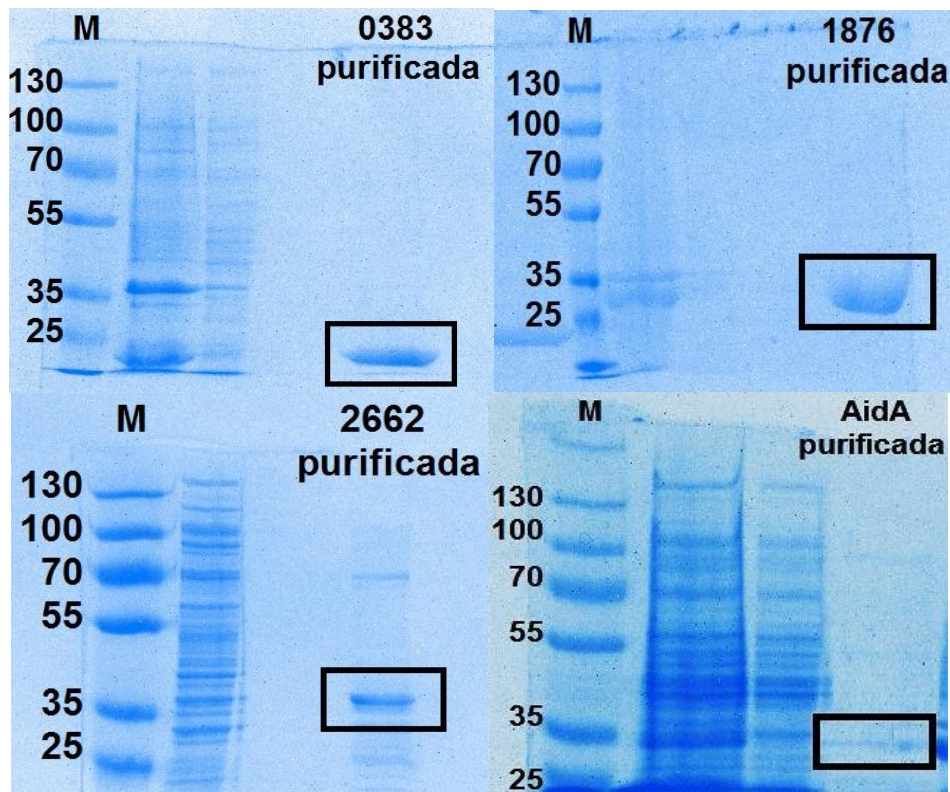


Figura 44. Lactonasas A1S_0383, A1S_1876, A1S_2662 y AidA purificadas a partir de extractos de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con pET28c(+)-*als_0383*, pET28c(+)-*als_1876*, pET28c(+)-*als_2662* o pET28c(+)-*aidA*, en geles de electroforesis desnaturalizante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) con tinción de azul de coomasie. El marcador molecular (en kDa) aparece en la calle de la izquierda. Las distintas calles se corresponden con alícuotas de las distintas fases del proceso de purificación. Las proteínas purificadas aparecen enmarcadas en la última calle de cada gel que se corresponde con el eluyente purificado obtenido tras cada purificación.

Las proteínas purificadas migraron como una única banda purificada en la calle del gel alrededor de la banda del marcador molecular de la banda de 25 kDa la A1S_0383 y de 35 kDa la A1S_1876, la A1S_2662 y AidA, en el tamaño correspondiente esperado con la cola de poli-histidina: ~25,88 kDa para A1S_0383, ~35,17 kDa para A1S_1876, ~37,60 kDa para A1S_2662 y ~33,3 kDa para AidA (Figura 44), calculados teóricamente.

Una vez obtenidas las proteínas purificadas, se determinó la concentración mínima activa de cada una necesaria para eliminar completamente una concentración de AHL de 10 μ M en un periodo de tiempo determinado. Para ello se realizaron diluciones

seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) en PBS pH 6,7 de una solución de cada enzima de concentración conocida y se realizó un bioensayo de producción de violaceína en medio sólido para las dos señales C6 y C12-HSL a 24 h (Figura 45).

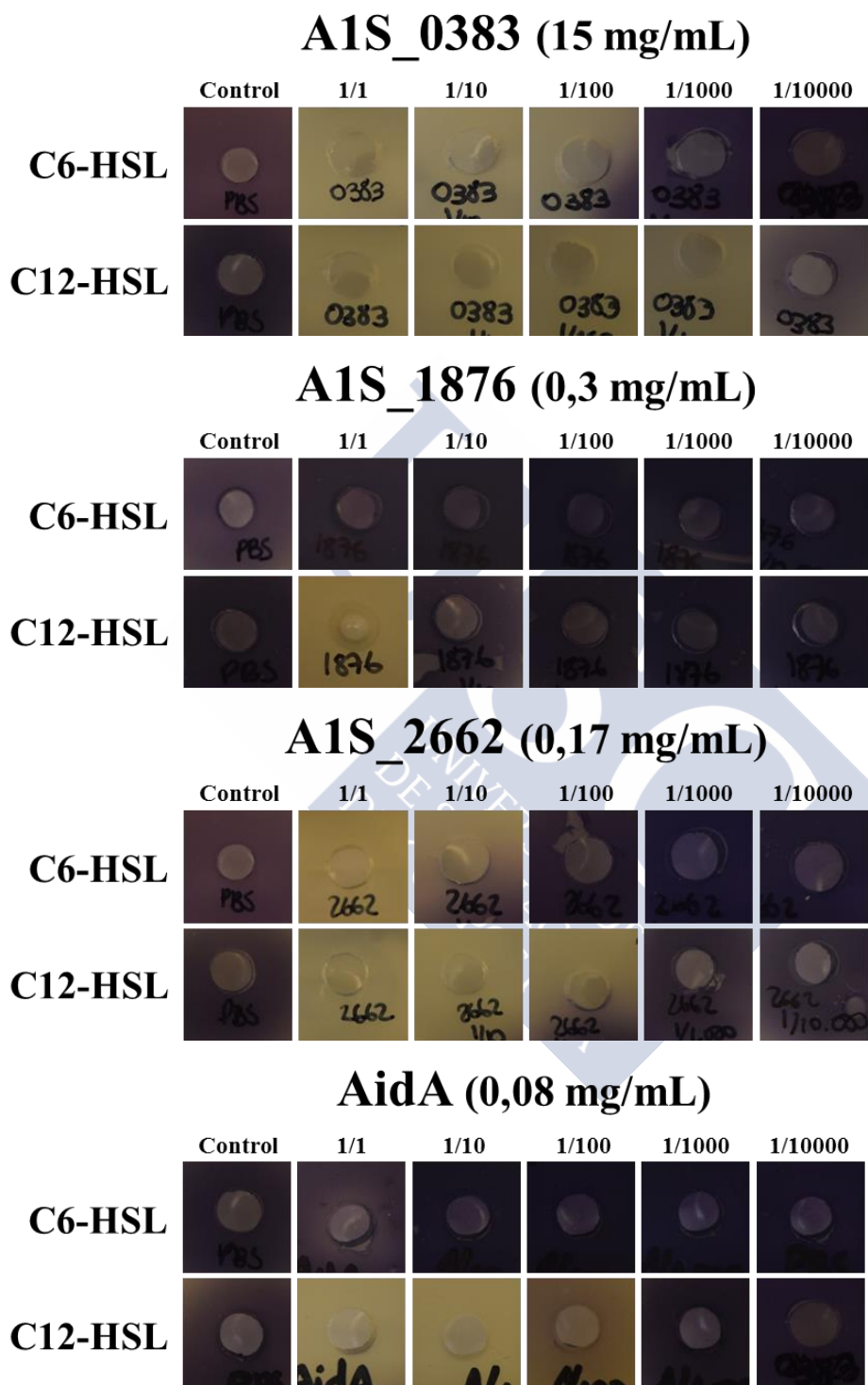


Figura 45. Concentración mínima activa a 24 h frente a C6 y C12-HSL de las lactonasas A1S_0383, A1S_1876, A1S_2662 y Aida purificadas, mediante bioensayo en medio sólido con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07, respectivamente. Se incubaron distintas diluciones de una solución de concentración conocida de cada proteína (A1S_0383: 15 mg/mL, A1S_1876: 0,3 mg/mL, A1S_2662: 0,17 mg/mL y Aida: 0,08 mg/mL) con las AHLs a una concentración final de 10 μ M durante 24 h. La concentración mínima activa se consideró la concentración de la mayor dilución que logró eliminar completamente la señal (ausencia de halo de violaceína) en el tiempo estipulado.

Como muestran los resultados, para la enzima A1S_0383 la concentración mínima activa fue 150 µg/mL para C6-HSL y un orden de magnitud menor para C12-HSL, 15 µg/mL (Figura 45). La concentración mínima activa para A1S_1876 fue 0,3 mg/mL para C12-HSL tras 24 h de incubación con la señal (Figura 45). En cuanto a la señal AHL de cadena corta no fue capaz de degradar la señal ni siquiera la proteína sin diluir (Figura 45). La concentración mínima activa de A1S_2662 para C6-HSL fue 17 µg/mL para 24 h de incubación con la señal y un orden de magnitud menor para C12-HSL, 1,7 µg/mL (Figura 45). Y para AidA, que no fue capaz de degradar la señal corta, la concentración mínima activa para C12-HSL fue 0,8 µg/mL (Figura 45). Sobre esta base, en todos los ensayos para su posterior caracterización se utilizó una concentración correspondiente a 10 veces la concentración mínima activa requerida para 24 horas sobre C12-HSL (Mayer et al. 2015).

Por último, se analizó la capacidad de las tres lactonasas encontradas purificadas, además de AidA, de degradar las AHLs siguientes: C4, C6, OC6, C8, C10, OC10, OHC10, C12, OC12, OHC12, OC13, C14, OC14 y OHC14-HSL, con una concentración 10 MAC de cada enzima durante 24 h a 22°C (Figura 46).

Las proteínas A1S_0383 y A1S_2662 fueron capaces de degradar una concentración de 10 µM de C6, C8, C10, OC10, OHC10, C12, OC12, OHC12, OC13, C14 y OC14-HSL, tras 24 h de exposición con cada señal (Figura 46), indicando que presentan actividad QQ de amplio espectro. La A1S_1876 degradó todas las AHLs probadas que detectan los biosensores de *C. violaceum* CV026 y VIR07 a esa concentración, excepto C6-HSL (al igual que el extracto celular de *E. coli* transformado con esta lactonasa) y C10-HSL (Figura 46). AidA degradó todas las AHLs probadas salvo C6-HSL, al igual que en célula viva y en extracto y presentó actividad débil contra OC13 y OC14-HSL (Figura 46).

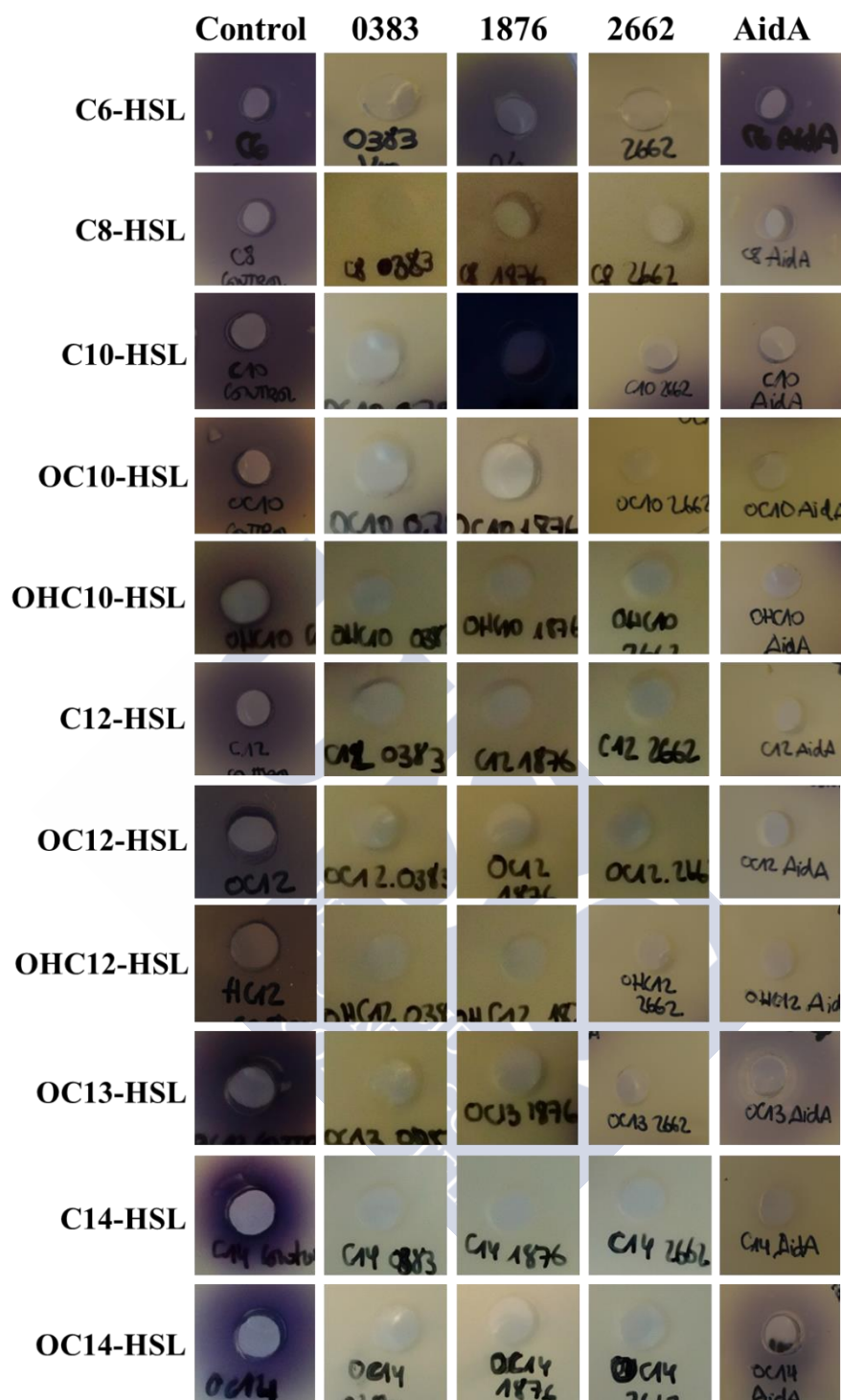


Figura 46. Especificidad de las lactonasa purificadas A1S_0383, A1S_1876, A1S_2662 y AidA de *A. baumannii* ATCC17978 con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 tras 24 h de exposición con cada AHL (10 μ M). Las lactonasa se probaron a una concentración 10 veces mayor que la mínima concentración activa sobre C12-HSL. Los controles se corresponden con la incubación de cada señal correspondiente con PBS pH 6,7.

Debido a que demostramos la actividad de tres nuevas lactonasa de QQ en ATCC17978, decidimos buscar adicionalmente si *A. nosocomialis* M2 y el resto de los aislados clínicos presentaban estas enzimas. Mediante análisis bioinformático observamos que M2 presenta un gen correspondiente por homología al que codifica para la lactonasa A1S_2662, pero en su genoma no se encontraron secuencias

exactamente idénticas a las lactonasas A1S_0383 y A1S_1876. Sin embargo, mediante amplificación con los cebadores utilizados para amplificar estas lactonasas en ATCC17978 se amplificaron fragmentos correspondientes a las tres lactonasas (datos no mostrados), indicando que probablemente no sean enzimas idénticas pero presenten algún tipo de homología. Debido a que no disponíamos del genoma del resto, se realizaron diversas PCRs con los mismos cebadores utilizados para *A. baumannii* ATCC17978. Como resultado, se obtuvieron fragmentos correspondientes a A1S_0383 mediante amplificación en todos los aislados probados (datos no mostrados). Sin embargo, A1S_1876 y A1S_2662 amplificaron en todos los aislados clínicos probados excepto en el aislado de *A. calcoaceticus*.

4. Expresión génica de las distintas lactonasas de *Acinetobacter*

Por último, se realizó una PCR cuantitativa de las lactonasas tanto putativas como confirmadas de *A. baumannii* ATCC17978 con el objetivo de determinar si presentan distintos niveles de expresión en distintas condiciones. En primer lugar, se determinó si las condiciones de cultivo (medio de cultivo y agitación) tenían algún efecto sobre la expresión de estas lactonasas en *A. baumannii* ATCC17978 que pudieran modificar la producción de AHLs propias. De esta manera, se realizó una PCR cuantitativa de las secuencias de las lactonasas encontradas mediante el análisis informático con mayor homología de secuencia (Tabla 7) e incluyendo la α/β hidrolasa AidA descrita en varios aislados de *A. baumannii* con actividad QQ (López et al. 2017), a partir de ARN extraído a las 6 h de cultivos en medio LB o LB con baja sal (0,5%) con o sin agitación (Figura 47).

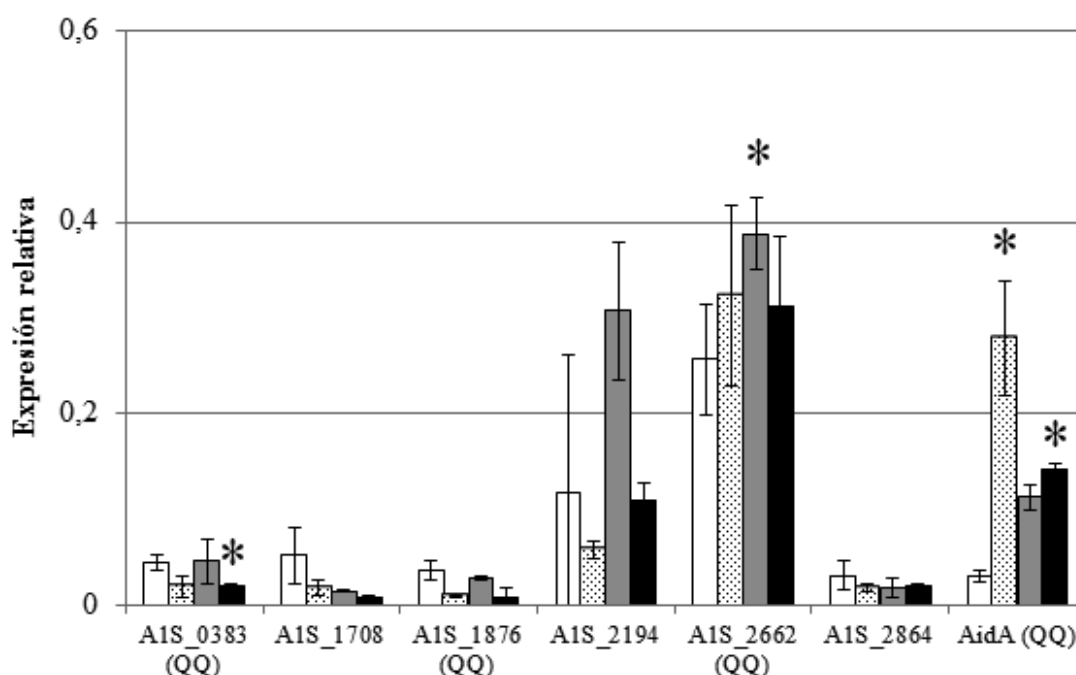


Figura 47. Expresión relativa de los genes correspondientes a las lactonasas A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2194, A1S_2662 y A1S_2864 de *A. baumannii* ATCC17978 y de la alfa/beta hidrolasa AidA de *A. baumannii* (López et al. 2017), en cultivos de LB agitados (barras blancas), cultivos de LB sin agitar (barras punteadas), cultivos de LB con baja sal (0,5%) agitados (barras grises) o cultivos de LB con baja sal sin agitar (barras negras) a las 6 h. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen *rpoB*, utilizado como control interno. Las barras de error muestran las desviaciones estándar (n=3). (QQ) indica la actividad QQ demostrada en este trabajo. Los asteriscos indican la significación frente al control del LB en agitación (prueba *t* de Student, $P < 0,05$).

La agitación no produjo un aumento significativo de ninguna enzima de QQ, indicando que probablemente la ausencia de AHLs en condiciones de agitación no se debe a la actividad QQ de la bacteria (Figura 47). Las condiciones estáticas, en las cuales se producen AHLs, solo produjeron un aumento significativo (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) de la alfa/beta hidrolasa AidA, sugiriendo una posible activación de esta enzima por el sistema de QS producido en estas condiciones.

La lactonasa más expresada fue A1S_2662 aunque su expresión no parece estar regulada por el sistema de QS (Figura 47), al igual que la del resto de las lactonasas, ya que en condiciones que producen AHLs (cultivos estáticos) no se expresaron significativamente en comparación con los cultivos en agitación (Figura 47).

La disminución de la sal en el medio de cultivo en condiciones de agitación produjo un claro aumento de los niveles de expresión de la lactonasa A1S_2194 y un aumento significativo (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) de la lactonasa A1S_2662 (Figura 47), indicando que su transcripción es independiente de la presencia de AHLs y que podrían estar sujetas a regulación por condiciones de cultivo. El resto de lactonasas no se expresaron a altos niveles en ninguna condición. Se debe hacer notar que este análisis se realizó a las 6 h, a las que aún no se detectaron AHLs en los cultivos de *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 8), por lo que se necesitaría comprobar si la expresión de las lactonasas se ve afectada a lo largo de la curva de crecimiento.

Tabla 8. Niveles de expresión de los genes correspondientes a las lactonasas A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2194, A1S_2662 y A1S_2864 de *A. baumannii* ATCC17978 y de la alfa/beta hidrolasa AidA de ATCC17978 (López et al. 2017), en cultivos de LB o LB con baja sal (0,5%) (<NaCl), agitados o sin agitar. Los niveles de expresión de cada gen se determinaron con respecto al nivel de expresión de *rpoB* utilizado como control interno. Los valores se muestran \pm las desviaciones estándar (n=3).

Gen	LB agitado	LB sin agitar	<NaCl agitado	<NaCl sin agitar
A1S_0383 ^(QQ)	0,044 \pm 0,008	0,019 \pm 0,012	0,046 \pm 0,023	0,020* \pm 0,003
A1S_1708	0,052 \pm 0,029	0,018 \pm 0,009	0,015 \pm 0,001	0,007 \pm 0,003
A1S_1876 ^(QQ)	0,037 \pm 0,010	0,010 \pm 0,001	0,029 \pm 0,002	0,008 \pm 0,011
A1S_2194	0,118 \pm 0,143	0,058 \pm 0,009	0,308 \pm 0,072	0,109 \pm 0,020
A1S_2662 ^(QQ)	0,257 \pm 0,057	0,323 \pm 0,094	0,388* \pm 0,038	0,312 \pm 0,073
A1S_2864	0,032 \pm 0,015	0,018 \pm 0,005	0,019 \pm 0,010	0,020 \pm 0,001
AidA	0,031 \pm 0,006	0,279* \pm 0,060	0,113 \pm 0,013	0,142* \pm 0,006

^{QQ}: Enzimas con actividad QQ demostrada en este estudio.

*: significativo (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) frente al LB agitado.

Por otro lado, se estudió el efecto de la AHL mayoritaria de *A. baumannii* ATCC17978, OHC12-HSL, sobre la expresión de los genes de las mismas, siguiendo el protocolo descrito por López et al. (2017), que permitió la identificación de la α/β hidrolasa con actividad putativa de QQ AidA. A diferencia de López et al. (2017), que utilizó OC12-HSL, en estos experimentos se utilizó la AHL mayoritaria de *A. baumannii*, OHC12-HSL. De este modo, se realizó una PCR cuantitativa de los genes de las secuencias proteicas encontradas (Tabla 7), a partir de ARN extraído de cultivos de 7 horas, en agitación, suplementados o no con OHC12-HSL, desde el inicio del cultivo (durante 7 h) y a las 6 h de cultivo (durante 1 h).

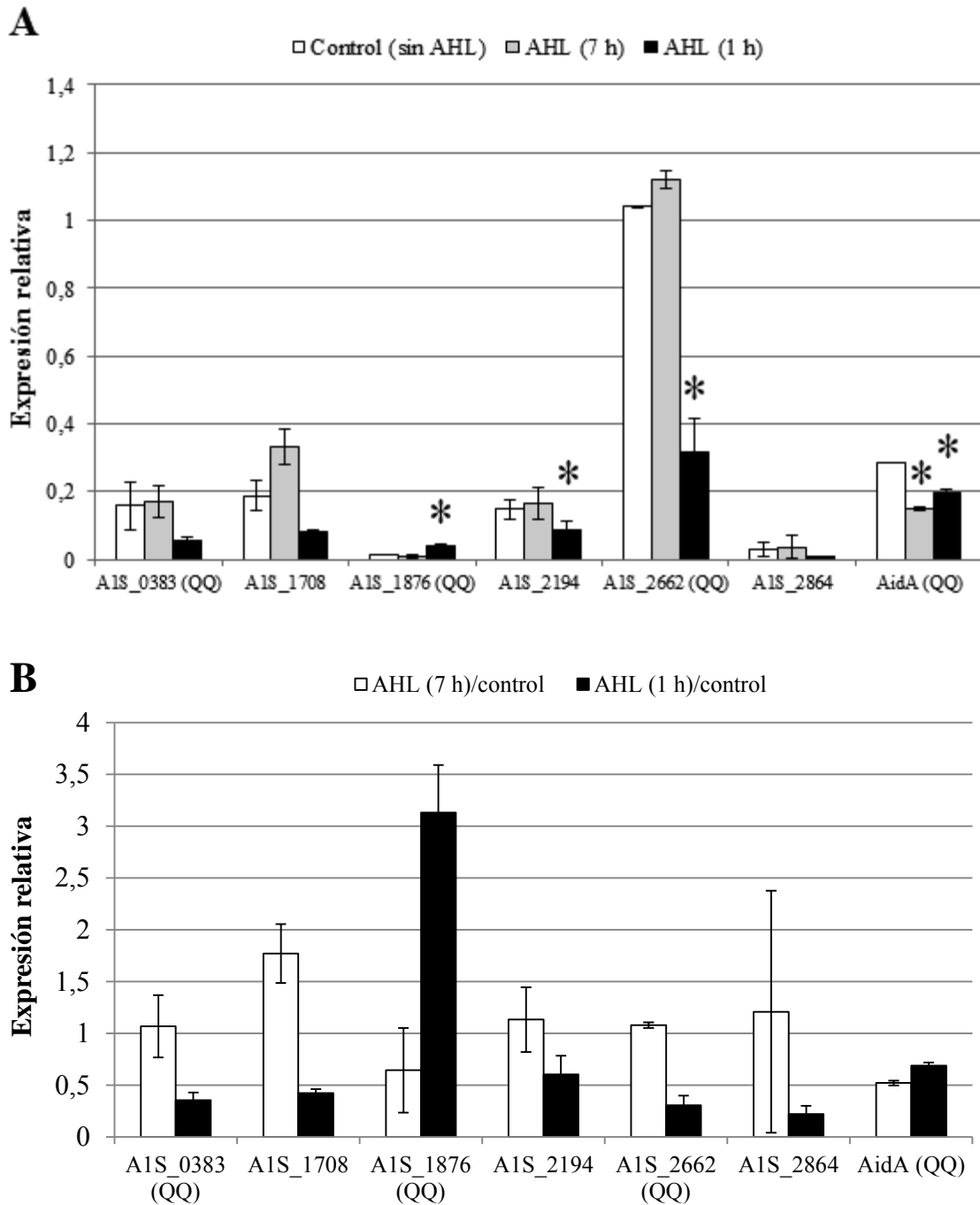


Figura 48. A) Expresión relativa de los genes correspondientes a las lactonasas A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2194, A1S_2662 y A1S_2864 de *A. baumannii* ATCC17978 y de la alfa/beta hidrolasa AidA de *A. baumannii* (López et al. 2017), en cultivos de LB con OHC12-HSL (10 μ M) añadida al inicio del cultivo (durante 7 h) o a las 6 h del cultivo (durante 1 h). A las 7 h se extrajo el ARN de todas las condiciones para realizar la PCR cuantitativa. Los valores se normalizaron con respecto a la expresión del gen *rpoB*, utilizado como control interno. **B)** Los mismos datos se expresaron normalizándolos respecto al control sin tratamiento de AHL. Las barras de error muestran las desviaciones estándar ($n=3$). (QQ) indica la actividad QQ demostrada en este trabajo. Los asteriscos indican la significación frente al control (prueba *t* de Student, $P<0,05$).

En general, todas las enzimas se transcribieron a bajos niveles en comparación con el gen control *rpoB*, excepto A1S_2662 (Figura 48A).

La adición de AHL al inicio del cultivo aumentó la expresión de la lactonasa A1S_1708 y disminuyó los niveles de expresión de la lactonasa A1S_1876 y AidA en

comparación con la condición control (Figura 48B). Sin embargo, los niveles de expresión de esta enzima son bajos en comparación con A1S_2662 o AidA. Al añadir OHC12-HSL a las 6 horas de cultivo y tras la incubación de 1 h con la AHL, aumentaron significativamente (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) los niveles de expresión del gen correspondiente a la lactonasa A1S_1876 en comparación con el control (Figura 48A y B). El resto de proteínas disminuyeron su expresión alrededor de la mitad respecto al control sin AHL (Figura 48 y tabla 9).

Tabla 9. Niveles de expresión de los genes correspondientes a las lactonasas A1S_0383, A1S_1708, A1S_1876, A1S_2194, A1S_2662 y A1S_2864 de *A. baumannii* ATCC17978 y de la alfa/beta hidrolasa AidA de *A. baumannii*, en cultivos de LB con OHC12-HSL (10 μ M) añadida al inicio del cultivo (durante 7 h) o a las 6 h del cultivo (durante 1 h). Los niveles de expresión de cada gen se determinaron con respecto al nivel de expresión de *rpoB* utilizado como control interno. Los valores se muestran \pm las desviaciones estándar (n=3).

Gen	Control (Sin AHL)	AHL (7 h)	AHL (1 h)
A1S_0383 ^{QQ}	0,158 \pm 0,069	0,169 \pm 0,047	0,056 \pm 0,012
A1S_1708	0,187 \pm 0,043	0,331 \pm 0,053	0,079 \pm 0,007
A1S_1876 ^{QQ}	0,013 \pm 0,002	0,008 \pm 0,005	0,040* \pm 0,006
A1S_2194	0,147 \pm 0,027	0,166 \pm 0,046	0,088* \pm 0,026
A1S_2662 ^{QQ}	1,039 \pm 0,005	1,121 \pm 0,027	0,317* \pm 0,098
A1S_2864	0,029 \pm 0,023	0,035 \pm 0,034	0,006 \pm 0,002
AidA	0,286 \pm 0,001	0,149* \pm 0,006	0,197* \pm 0,009

^{QQ}: Enzimas con actividad QQ demostrada en este estudio.

*: significativo (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) frente al control.

Discusión

A. baumannii ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y sus respectivos mutantes presentaron actividad QQ tanto en célula viva como en extractos celulares (Figuras 32, 34 y 37). Las células vivas de todos los aislados clínicos de *A. baumannii* y *A. calcoaceticus* también fueron capaces de degradar AHLs (Figura 33), reforzando la coexistencia de QS y QQ en este patógeno. El análisis de HPLC-MS confirmó la actividad QQ de los extractos de *A. baumannii* ATCC17978, especialmente contra AHLs de cadena larga (Figura 38). Tras la acidificación de las reacciones, se recuperó señal, solo para OHC12-HSL indicando al menos la presencia de actividad lactonasa contra esta señal (Mayer et al 2015). Sin embargo, casi no se recuperó C12-HSL, revelando que *A. baumannii* ATCC17978 podría presentar más de una enzima de QQ con otra actividad enzimática distinta. Los sobrenadantes fueron también activos contra la señal de cadena corta a partir de las 24 h (Figura 36), explicando que en las células vivas (cultivos de 24 h) no observásemos actividad de degradación contra C6-HSL. La hipótesis de la existencia de más enzimas de QQ en *Acinetobacter* con distinta actividad QQ también explicaría estas diferencias de actividad entre extractos y sobrenadantes.

Las condiciones del cultivo afectaron a la actividad QQ de modo similar a lo descrito en el anterior capítulo sobre la producción de señales de QS o sobre la motilidad. Además, la actividad QQ de ambas especies fue dependiente del tiempo de cultivo (Figuras 34 y 37). Las condiciones que permiten la mayor producción de AHLs (limitación de sal en condiciones estáticas), retardaron la aparición de la actividad QQ en extractos de *A. baumannii* ATCC17978 hasta las 17 h de cultivo coincidiendo con el pico más alto de producción de señales (Figura 37). Este hecho podría explicar la gran concentración de AHLs detectada en estas condiciones en el capítulo anterior (Figura 26), que permitiría la sobre-producción de motilidad asociada a superficie en *A. baumannii* ATCC17978. La agitación de los cultivos permitió la degradación de las AHLs ya en la fase exponencial (6 h) y con actividad QQ intermitente en el tiempo. Sin embargo, en esta condición no encontramos ninguna correlación entre la expresión de las enzimas con la presencia de QQ en bioensayo, apoyando la hipótesis de que *A. baumannii* ATCC17978 presente otras enzimas de QQ responsables de su actividad.

La búsqueda de enzimas de QQ mediante análisis bioinformático, reveló la presencia de siete posibles secuencias con actividad QQ de tipo lactonasa en *A. baumannii* ATCC17978, además de la α/β hidrolasa AidA con actividad putativa de QQ descrita en varios aislados de *A. baumannii* (López et al. 2017), de las cuales se consiguió la purificación de tres de ellas. En este trabajo confirmamos la presencia de actividad QQ de la A1S_2662 que se corresponde con la lactonasa putativa de QQ YtnP de *A. baumannii* A155 depositada en el NCBI (Arivett et al. 2015) y con la enzima candidata de QQ encontrada en una búsqueda de enzimas de QQ en la cepa multirresistente a drogas *A. baumannii* AYE, en la cepa sensible a antibióticos *A. baumannii* SDF y en la cepa ambiental *A. baylyi* ADP1 (Vallenet et al. 2008). Adicionalmente demostramos la actividad QQ de dos nuevas lactonasas en ATCC17978 no identificadas anteriormente, la A1S_0383 y la A1S_1876. La A1S_0383 presentó menos de un 30% de homología con YtnP y Y2-AiiA de *A. baumannii* A155 (Arivett et al. 2015) y con AiiA de *Bacillus* sp. 240B1 (Dong et al. 2000). La A1S_1876 fue la más diferente a las lactonasas conocidas mostrando baja similitud con AiiA y ninguna similitud con las otras lactonasas de *Acinetobacter*. Todas las secuencias obtenidas de *A. baumannii* ATCC17978 presentaron el dominio conservado de unión a zinc característico de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, que se encuentra bien caracterizado y representado por la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp. 240B1 (Dong et al. 2000). Las lactonasas purificadas mostraron preferencia de degradación de AHLs de

cadena larga como los extractos probados y actividad QQ de amplio espectro, salvo la A1S_1876 y AidA que no fueron capaces de degradar todas las AHLs probadas (Figura 46).

En el género *Acinetobacter* ya se ha descrito actividad enzimática de tipo lactonasa y acilasa. Chan et al. (2011) sugirieron la degradación de AHLs vía lactonólisis tras la acidificación de las muestras y su detección con el biosensor de *C. violaceum*. Por el contrario, en la cepa *Acinetobacter* sp. Ooi24, aislada de aguas residuales de plantas de tratamiento de residuos, se encontró una acilasa de QQ perteneciente a la familia amidasa y denominada AmiE, la cual mostró una alta actividad de degradación contra AHLs de cadena larga (C8, C12 y especialmente C10-HSL, con preferencia de actividad contra las no sustituidas), débil contra C6-HSL y sin actividad contra C4-HSL. Además, no mostró recuperación de la AHL OC10-HSL tras 6 h de acidificación a pH 2,0 (Ochiai et al 2014), coincidiendo con los resultados de la poca recuperación de la señal C12-HSL en *A. baumannii* ATCC17978 en este capítulo. A pesar de que distintos autores han descrito secuencias de QQ en *Acinetobacter* spp., hasta el momento solo se había demostrado la capacidad de degradación de AHLs de la acilasa AmiE (Ochiai et al. 2014) y de la lactonasa AidE de *Acinetobacter* sp. 77 (Liu et al. 2017). Además, se encontró un homólogo de la acilasa AmiE en las secuencias genómicas de otras dos especies de *Acinetobacter*, *A. urisingii* CIP107286 y *Acinetobacter* sp. CIP102129, sin embargo, no presentó ninguna secuencia homóloga en ningún genoma completo de otras especies de *Acinetobacter* depositadas en las bases de datos del DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*), EMBL-EBI y GenBank del NCBI (Ochiai et al. 2014). Parece ser que el gen *aidE* tampoco está conservado en especies de *Acinetobacter* (Liu et al. 2017). A pesar de que en *A. baumannii* ATCC17978 no presenta un gen homólogo a la acilasa AmiE, la baja recuperación de la señal C12-HSL en los análisis de HPLC-MS junto con todo esto mencionado apoyaría la existencia de alguna enzima de QQ con actividad acilasa en *A. baumannii* ATCC17978 que degrade preferentemente esta señal.

La mayoría de acilasas de AHLs degradan de manera más efectiva AHLs de cadena larga que las de cadena corta e incluso algunas acilasas son incapaces de degradar AHLs con cadenas más cortas de ocho carbonos (Uroz et al. 2009). Es posible que coexista la actividad lactonasa al mismo tiempo que la acilasa, como ocurre en otras bacterias como en *Deinococcus radiodurans* R1, *Hyphomonas neptunium* ATCC15444 y *Photobacterium luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 (Kalia et al. 2011). Se ha descrito ya bacterias capaces de degradar AHLs con uno o dos enzimas responsables de actividad QQ, a excepción de *Pseudomonas aeruginosa* que contiene varias acilasas y *Rhizobium* sp. NGR234 que posee hasta cinco enzimas de QQ, entre ellos dos lactonasas, DhIR y QsdR1 (Krysciak et al. 2011). En *A. baumannii* alguna o varias de las enzimas podrían ser excretadas al sobrenadante presentando actividad de degradación contra señales cortas mientras que las enzimas intracelulares o que forman parte de la membrana celular presentarían una actividad QQ específica de AHLs de cadena larga (Romero et al. 2014). La dificultad de buscar acilasas de QQ en el genoma bacteriano, debido a la ausencia de dominios conservados en las secuencias limitó nuestra búsqueda de enzimas de QQ en *A. baumannii* ATCC17978, de modo que podríamos estar subestimando la existencia de más enzimas capaces de degradar señales AHLs en este patógeno. A la dificultad de estos análisis se suma la baja similitud entre lactonasas de AHLs conocidas y que el motivo conservado HXHXDH lo comparten numerosas familias de proteínas sin relación funcional entre ellas (Vallenet et al. 2008). Por las limitaciones comentadas no descartamos que existan más lactonasas o acilasas en *A. baumannii* ATCC17978.

Por otra parte, hay que añadir que las enzimas encontradas en este estudio puede que sean capaces de degradar AHLs por su condición de lactonasas, pero que en la

bacteria no actúen como tal y desempeñen otras funciones distintas. Existe la hipótesis que propone un papel de las enzimas con actividad lactonasa en la defensa contra la producción de antibióticos (Romero et al. 2012). Recientemente se ha propuesto que las *N*-acil homoserín lactonas además de funcionar como moléculas de señalización, pueden desempeñar otras funciones biológicas actuando como quelantes de hierro o desempeñando propiedades antibióticas (revisado por Romero et al. 2011b). En el ambiente natural los antibióticos se encuentran a menudo en concentraciones sub-inhedoras ejerciendo como moléculas involucradas en los procesos de señalización intracelular y formación de biopelículas (Sengupta et al. 2013). Por ejemplo, la señal OC6-HSL producida en *P. aeruginosa* tiene propiedades antibióticas contra bacterias Gram-positivas (Kaufman et al. 2005) y OC10-HSL y otras AHLs oxo-sustituidas con 8, 10 y 14 carbonos en la cadena lateral, también mostraron inhibición de crecimiento en *Staphylococcus aureus* (Qazi et al. 2006). Las lactonasas son las enzimas capaces de degradar un mayor rango de AHLs en contraste con las AHL acilasas y paraoxonasas (Dong et al. 2007, Romero et al. 2015), ya que hidrolizan un gran número de estas señales independientemente del tamaño y de las sustituciones de la cadena lateral acil, con una eficacia similar, pero carecen o presentan una pequeña actividad residual frente a otras moléculas químicas, como las no acil lactonas y ésteres no cíclicos (Wang et al. 2004). Las acilasas, sin embargo, muestran más especificidad de AHLs, probablemente debido a que tienen que reconocer la cadena acil de la señal como ocurre con la acilasa PvdQ de *Pseudomonas* (Bokhove et al. 2010, Romero et al. 2015).

Al mismo tiempo que *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 degradan señales de QS, producen mayoritariamente la AHL de cadena larga OHC12-HSL (Figura 8, tabla 2). Este hecho podría indicar una autorregulación de su propia producción de AHLs, explicando que tras 24 h de cultivo la concentración de las señales de QS decrezca drásticamente (Figura 8) y apoyando la importancia del QQ en este patógeno. La cepa ambiental *Acinetobacter* sp. GG2 produce OHC12-HSL como la señal mayoritaria alcanzando el máximo nivel a las 12 h de cultivo y rápidamente disminuye su presencia hasta ser casi indetectable a las 24 h (Chan et al. 2011), tal y como detectamos en ATCC17978 y M2 en el primer capítulo. Al mismo tiempo *A. baumannii* sp. GG2 exhibe actividad QQ de amplio espectro especialmente contra AHLs de cadena larga, sugiriendo un control de la producción y del cese de la síntesis de la AHL propia e indicando que la expresión (o no expresión) de los genes diana de QS no es necesaria en la fase estacionaria (Chan et al. 2011, How et al. 2015). La actividad de QQ específica contra AHLs de cadena larga también se ha observado en *Acinetobacter* spp. del suelo o aguas residuales (Kang et al. 2004, Chan et al. 2011, Kim et al. 2014, Ochiai et al. 2014) y en la α/β hidrolasa AidA encontrada en varios aislados de *A. baumannii* que presentó actividad QQ contra OC12-HSL, de acuerdo con nuestras observaciones. Aunque hay autores que relacionan la ausencia de señales AHLs de cadena corta en *Acinetobacter* con que puedan ser degradadas mediante enzimas de QQ antes de ser identificadas (Chow et al. 2014, Erdönmez et al. 2017), en este trabajo confirmamos que *Acinetobacter* presenta poca afinidad por AHLs de cadena corta. Además, las diferencias de actividad QQ entre cultivos agitados y no agitados no justifican la ausencia de detección de señales de QS en agitación, por lo que podemos concluir que el QQ no es la causa de que no haya AHLs en esas condiciones.

En este trabajo además identificamos la producción de distintas AHLs en ambas especies y en el resto de los aislados de *Acinetobacter* (Tablas 2 y 3). Por esta razón, *Acinetobacter* podría estar usando su actividad QQ para modular su actividad QS, modificando o degradando sus AHLs en función de sus necesidades. De este modo, unas enzimas podrían degradar unas AHLs concretas y otras, en otras condiciones,

expresarse para degradar otro tipo de AHLs. También podrían actuar en condiciones específicas o expresarse en distintos puntos de la curva de crecimiento, haciendo más complicado y eficaz el mecanismo de regulación de las funciones controladas por QS en este patógeno. Además, la presencia conjunta de actividad acilasa y lactonasa, observada en especies de *Acinetobacter*, podría ayudarle a desarrollar su formidable adaptabilidad ya descrita en diversos hábitats. El número de enzimas encontradas en *A. baumannii* ATCC17978 y su distinta regulación corroboran la importancia del QS en este patógeno revelando un papel fisiológico relevante. Un estudio reciente ha sugerido un papel fisiológico relevante de los procesos de QQ debido a la abundancia de secuencias de QQ encontradas en metagenomas marinos (Muras et al. 2018a). La presencia de QQ también podría intervenir en las relaciones interespecíficas y con otros patógenos, degradando señales de otras bacterias como defensa y como parte de la estrategia expansiva que presenta este patógeno.

La presencia de bacterias productoras y degradadoras de AHLs conjuntamente en varios ecosistemas ha sido justificada como una estrategia para la adquisición de ventajas competitivas (Morohoshi et al. 2009). Un ejemplo de bacterias que poseen ambas actividades es *A. tumefaciens*, que produce y degrada OC8-HSL mediante la lactonasa AttM durante la fase estacionaria temprana, cuando la enzima es activada por señales de inanición (Zhang et al. 2002, 2004). De forma similar, una cepa marina de *Shewanella*, la cual produce AHLs en la fase exponencial tardía, degrada sus propias señales de QS en la fase estacionaria mediante actividad lactonasa y acilasa/amidasa (Tait et al. 2009). De este modo, en biopelículas polimicrobianas, esta *Shewanella* interfiere con la producción de AHLs de otras bacterias (Tait et al. 2009). Todo esto indica que las especies degradadoras de AHLs pueden afectar el comportamiento de la comunidad bacteriana mediante la interferencia del QS entre bacterias vecinas, y más importante aún, estas interacciones pueden ejercer grandes efectos ecológicos sobre diferentes reinos (Tait et al. 2009). Por otra parte, las especies del género *Acinetobacter* son conocidas por su elevada capacidad de degradación de varios ácidos dicarboxílicos de cadena larga y compuestos aromáticos hidroxilados que están asociados con plantas de tratamientos de residuos (Yoshida et al. 1975, Jung et al. 2010, Kang y Park 2010b). También se ha descrito la capacidad de *Acinetobacter* spp. de crecer en medios de cultivo enriquecidos con OC6-HSL como fuente de carbono y nitrógeno (Chan et al. 2011). Un trabajo sobre bacterias con QS y bacterias con QQ en plantas de tratamiento de residuos, donde el QS está implicado en la formación de una biopelícula en la superficie de membrana de los biorreactores del sistema de tratamiento de aguas residuales, reveló que el género *Acinetobacter* es el mayoritario entre las bacterias que se encuentran en los lodos activados implicados en procesos de biorremediación. La mayoría de las especies encontradas (21) presentaron QQ (Ochiai et al. 2013), aunque no existe ninguna relación entre la actividad QQ y la posición filogenética de cada especie de *Acinetobacter* y tampoco se encontraron diferencias significativas entre el área de muestreo y la especificidad de las cepas de *Acinetobacter* degradadoras de AHLs. Sin embargo, la mayoría de las especies del género identificadas en ese estudio mostraron actividad muy débil contra C6-HSL (Ochiai et al. 2013), coincidiendo con nuestros resultados. En especial las bacterias que producen y/o modifican/degradan señales de QS son las que tienen mayor impacto en las propiedades de los ecosistemas polimicrobianos (Chan et al. 2011).

La adición de de la AHL mayoritaria de *A. baumannii* a las 6 h de cultivo produjo un aumento de los niveles de expresión de la lactonasa A1S_1876 respecto al control, indicando un papel importante de la misma como lactonasa de QQ en esta especie. Sin embargo, se expresa a bajas concentraciones, a diferencia de la A1S_2662.

Curiosamente los niveles de expresión de la α/β hidrolasa AidA no aumentaron al añadir OHC12-HSL a los cultivos ni a tiempo 0 ni a las 6 h del cultivo. AidA fue identificada recientemente mediante estudios de transcriptómica en varios aislados de *A. baumannii* tras la adición de la señal OC12-HSL (López et al. 2017). Sin embargo, aunque *A. baumannii* ATCC17978 produce esta AHL, lo hace en mucha menor cantidad que la OHC12-HSL (Tabla 2), además de que no es la señal específica del receptor AbaR (Kim y Park 2013). Debido a que el genoma del aislado Ab7, que fue el único que presentó motilidad en el medio de cultivo LBM no presentó el gen *aidA*, se asoció la presencia de la enzima con la ausencia de motilidad (López et al. 2017). Sin embargo, en este capítulo demostramos que el aislado Ab7 como el resto, es capaz de degradar AHLs de cadena larga (Figura 33) y que no se puede asociar la ausencia de la enzima AidA con la motilidad en el medio LBM, puesto que *A. baumannii* ATCC17978 presenta esta enzima y es motil en ese medio de cultivo (Figura 17). Hay que añadir que *A. nosocomialis* M2, también motil en el medio LBM, no presenta un gen idéntico a *aidA* en su genoma aunque existe una α/β hidrolasa con un 35% de homología con AidA. Aunque M2 presenta un gen correspondiente por homología al que codifica para la lactonasa A1S_2662, en su genoma no se encontraron secuencias idénticas a las lactonasas A1S_0383 y A1S_1876, aunque se obtuvieron fragmentos amplificados con los cebadores de estas lactonasas, indicando que presenta enzimas similares. Adicionalmente, en el resto de los aislados clínicos amplificó un fragmento similar a A1S_0383 y en todos salvo en el aislado de *A. calcoaceticus* amplificaron fragmentos similares a A1S_1876 y A1S_2662, indicando que distintas especies podrían presentar diferente regulación de señales de QS a través de sus enzimas de QQ.

Como ya mencionamos, las condiciones que permiten la mayor detección de señales de QS en *A. baumannii* ATCC17978 no produjeron cambios significativos en las lactonasas que purificamos. Sin embargo, la expresión de AidA se vio positivamente afectada en estas condiciones, indicando que está sujeta a mayor regulación por el QS. Esto podría explicarse si pensamos en la existencia de enzimas de QQ constitutivos en este patógeno y otras enzimas que realicen su actividad de QQ cuando lo necesite la bacteria proporcionándole mayor regulación y control en respuesta a los cambios ambientales. AidA podría actuar contra otras AHLs secundarias, de producción propia o no, pudiendo interactuar con otras especies. Sin embargo, se necesitaría un estudio más exhaustivo de la expresión de las distintas lactonasas a lo largo de la curva de crecimiento de *A. baumannii* para poder correlacionarlas con la actividad QQ de cada tiempo determinado.

Adicionalmente, los sistemas de QS y QQ podrían estar relacionados con la adquisición de resistencia a antibióticos ya que producen una reducción de la producción de señales de QS en *Acinetobacter* sp. DR1R, posiblemente mediada por la sobre-expresión de una lactonasa putativa de AHLs (Kang y Park 2010a). La cepa *Acinetobacter* sp. DR1R es una variante de la cepa DR1 resistente al antibiótico rifampicina que solo presenta una señal de QS frente a la cepa salvaje en la cual se detectaron 3 señales. Debido a que la expresión de la sintasa fue similar en ambas, los autores del trabajo explican que la diferencia de señales podría ser degradada por una lactonasa de AHLs que se sobre-expresa, entre otras proteínas, en la variante resistente DR1R al igual que en el mutante de la sintasa (Kang y Park 2010a), que se corresponde por homología con la lactonasa A1S_2864 encontrada en este capítulo. Sin embargo, el mutante *ΔadeB*, componente principal de la bomba de expulsión de antibióticos en *A. baumannii* ATCC17978, AdeABC, degradó C12-HSL en célula viva como su cepa parental, además de presentar un perfil de AHLs con menor número y concentración de señales de QS, demostrado en el primer capítulo, al contrario que estos autores. Otro

estudio, sin embargo, que asocia también la resistencia a antibióticos con la pérdida del QS, determinó la baja regulación de genes involucrados en el QS, entre otros, de *A. baumannii* ATCC17978 mediante selección con el antibiótico imipenem, resultando al final en una disminución de la formación de biopelícula (Chang et al. 2014). De todas formas, el hecho de que la adquisición de resistencia a antibióticos resulte en una disminución de la producción de señales de QS a través de la regulación de enzimas de QQ, podría ocurrir solo para ciertos antibióticos o a través de determinadas bombas de antibióticos. De hecho, los cambios que se producen al adquirir resistencia a antibióticos en la cepa *Acinetobacter* sp. DR1 son más acusados en una variante resistente a ampicilina, DR1A (Kang y Park 2010b). Hay que añadir, que la exposición a antibióticos también puede modificar la permeabilidad de la membrana de la célula, afectando al tráfico de señales de QS (Kang y Park 2010b). Sería necesario analizar la expresión de las enzimas de QQ en esta cepa y examinar los niveles de la sintasa de AHLs en el mutante, para determinar la relación exacta de esta bomba con los sistemas de QS y QQ.



CAPÍTULO 3. Quorum sensing y formación de biopelícula en *A.baumannii*

Antecedentes

A. baumannii es capaz de sobrevivir periodos largos de tiempo gracias a la formación de *biofilm* o biopelícula sobre cualquier tipo de sustrato desarrollando una matriz extracelular que lo protege de condiciones extremas de desecación e inanición y de tratamientos con numerosos antimicrobianos (Gaddy y Actis 2009). La formación de biopelícula es un proceso multifactorial en el que intervienen diversos factores entre los que se encuentra el QS. Ya se ha descrito que las mutaciones de la sintasa y del receptor de AHLs reducen la formación de biopelícula en distintas especies de *Acinetobacter* (Niu et al. 2008, Kang y Park 2010a, Anbazhagan et al. 2012, Bhargava et al. 2012, Kim y Park 2013, Chow et al. 2014, Oh y Choi 2015). También se ha observado una correlación significativa entre la sobre-expresión de la sintasa *abal* y la formación de biopelícula durante la transición de células planctónicas a células de biopelículas, sugiriendo una asociación positiva entre el QS y la formación de biopelícula en *A. baumannii* (Rumbo-Feal et al. 2013, He et al. 2015). Uno de los genes del operón, A1S_0114, que codifica para una proteína transportadora de acilos, se expresa exclusivamente en las biopelículas de ATCC17978 y es inhibida por completo en las células planctónicas (Rumbo-Feal et al. 2013). Además, en un mutante de esta proteína, se observó una disminución considerable de la sintasa *abal* además de otros dos genes del operón, relacionando la formación de biopelícula con el QS (Rumbo-Feal et al. 2013). Por otra parte, los sistemas de eflujo de antibióticos de tipo RND, como el sistema AdeABC, juegan un papel fundamental en la adquisición de resistencias en *A. baumannii* (Magnet et al. 2001). Estas bombas de antibióticos se han relacionado con el tráfico de QS en otros patógenos, sin embargo, el papel de la bomba AdeABC de expulsión de antibióticos en la formación de biopelícula de *A. baumannii* aún está por determinar.

El objetivo de este último capítulo fue la caracterización de la formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 para investigar la relación entre la biopelícula y el sistema de QS en esta especie. También se incluyó *A. nosocomialis* M2 y los mutantes respectivos de las sintasas de AHLs, además del mutante $\Delta adeB$ de *A. baumannii* ATCC17978 de la bomba de expulsión AdeABC, en el estudio de la formación de biopelícula. Las biopelículas mejoran la colonización y la persistencia en ambientes hospitalarios de *A. baumannii*, por lo que el desarrollo de estrategias que inhiban o eliminen la biopelícula que produce es un aspecto crítico para prevenir o evitar las infecciones nosocomiales causadas por este patógeno. Dos trabajos han observado la capacidad de las enzimas de QQ contra la formación de biopelícula en aislados de *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* y *A. nosocomialis* M2 (Choi et al. 2013, Zhang et al. 2017), sin embargo, por eso adicionalmente, se determinó el efecto de la lactonasa termoestable Aii20J, aislada de *Tenacibaculum* sp. 20J y con actividad QQ de amplio espectro (Mayer et al. 2015), contra la formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978.

Resultados

1. Evaluación de distintos métodos de cultivo para la formación de biopelícula de *A. baumannii*

Con el objetivo de estudiar la relación entre la formación de biopelícula de *A. baumannii* y el sistema de QS se realizaron inicialmente diversos ensayos con distintos modelos para ajustar las condiciones óptimas para el desarrollo de la biopelícula de este patógeno.

1.1. Formación de biopelícula en placas microtiter

1.1.1. Comparación entre placas microtiter de 96 pocillos y 24 pocillos

En primer lugar, se analizó la capacidad de formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante de la sintasa de AHLs *abaI* en placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos frente a placas de 24 pocillos. La biopelícula se cuantificó mediante la tinción de cristal violeta. Trabajos anteriores han relacionado las bombas de expulsión de antibióticos con la expulsión de AHLs exógenas en otros patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, permitiendo seleccionar la unión de la AHL con su receptor de forma específica (Minagawa et al. 2012). También se ha observado una correlación positiva entre la formación de biopelícula en aislados clínicos de *A. baumannii* y la sobre-expresión de los genes *adeB* y *adeG* de las bombas de eflujo AdeABC y AdeFGH, respectivamente, creando una asociación entre la familia de bombas de tipo RND y las biopelículas de *A. baumannii* (He et al. 2015). Por esta razón, también incluimos en el ensayo de formación de biopelícula el mutante de la bomba de eflujo de antibióticos $\Delta adeB$ de *A. baumannii* ATCC17978, que codifica para el transportador multidrogas y constituye el componente principal de la bomba de eflujo AdeABC, una de las mejor caracterizadas en *A. baumannii* (Marchand et al. 2004).

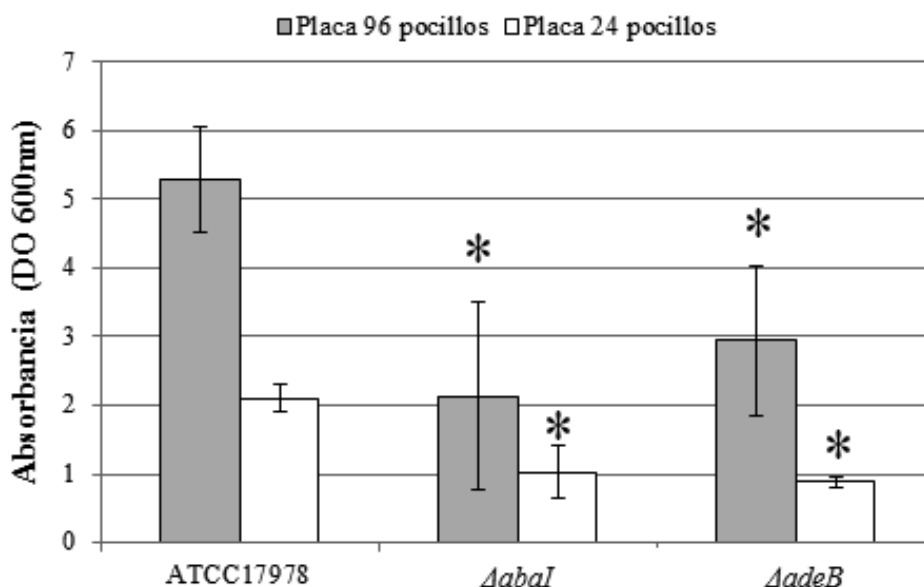


Figura 49. Formación de biopelícula de 24 h por *A. baumannii* ATCC17978, el mutante de la sintasa $\Delta abaI$ y el mutante de la bomba $\Delta adeB$, en placa microtiter de 96 pocillos o 24 pocillos de cuantificado mediante tinción con cristal violeta. Las muestras se realizaron con seis réplicas, mostrándose la media y la desviación estándar. Los asteriscos indican la significación frente a los controles respectivos de la cepa parental (prueba *t* de Student, $P < 0,05$).

Como se observa en la figura 49, representativa de varios experimentos distintos, los mutantes tanto de la sintasa de AHLs como el de la bomba de eflujo de antibióticos formaron menor cantidad de biopelícula que la cepa parental en ambos tipos de placa (prueba *t* de Student, $P < 0,05$). Sin embargo, las diferencias entre el mutante $\Delta abal$ y la cepa parental fueron mayores en los pocillos más pequeños (placa de 96 pocillos) en los cuales, además, la formación de biopelícula fue casi el doble, por lo que elegimos las placas de 96 pocillos para continuar caracterizando la biopelícula en los siguientes ensayos.

1.1.2. Inhibición de la formación de biopelícula en placas microtiter

Debido a que los ensayos preliminares de formación de biopelícula sugieren una influencia del QS sobre la formación de biopelícula en *A. baumannii*, se repitieron los ensayos de formación de biopelícula añadiendo la lactonasa Aii20J con actividad QQ anti-AHL utilizada a lo largo de este trabajo, ya que es activa contra las señales de *A. baumannii* como demostramos en el primer capítulo (Figura 19). Para ello, se analizó la capacidad de formación de biopelícula en placas microtiter de 96 pocillos de *A. baumannii* ATCC17978, del mutante de la sintasa de AHLs $\Delta abal$ y del mutante de la bomba de eflujo de antibióticos $\Delta adeB$ en presencia o no de Aii20J (Figura 50).

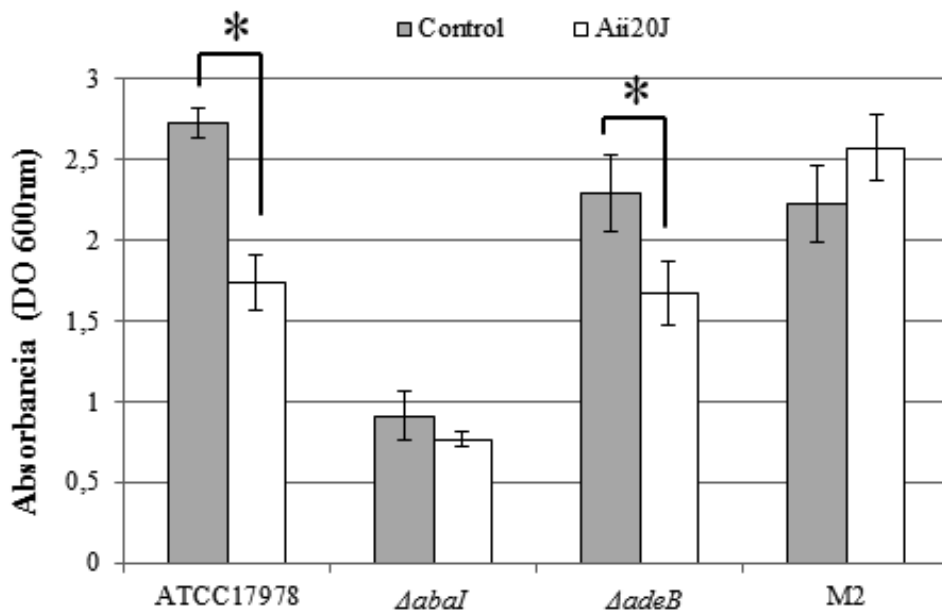


Figura 50. Formación de biopelícula por *A. baumannii* ATCC17978, el mutante $\Delta abal$, el mutante $\Delta adeB$ y *A. nosocomialis* M2, cuantificada mediante cristal violeta después de 24 h, con y sin adición de la lactonasa Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos son la media de 6 pocillos independientes, mostrándose la media y la desviación estándar. Los datos significativos (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) respecto a la condición control se indican con asteriscos.

En la figura 50 se observa que el mutante de la sintasa de AHLs $\Delta abal$ presentó una disminución en la formación de biopelícula de alrededor de un 70% en comparación con su cepa parental. Sin embargo, en este experimento el mutante de la bomba $\Delta adeB$ solo presentó una ligera reducción en comparación a la cepa parental. La adición de la lactonasa de QQ Aii20J resultó en una reducción significativa (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) en la cantidad de biopelícula formada por *A. baumannii* ATCC17978 y por el mutante $\Delta adeB$, sin afectar significativamente a la producción de biopelícula en el mutante $\Delta abal$ (Figura 50). Además, la inhibición de crecimiento al añadir la lactonasa

Aii20J, medida como densidad óptica (600 nm) en los cultivos, no fue en ningún caso significativa (datos no mostrados). *A. nosocomialis* M2 formó en general gran cantidad de biopelícula, sin embargo, la lactonasa no afectó a este fenotipo, al igual que ocurre con la motilidad de esta especie (Figuras 20 y 21).

Además de cuantificar la biopelícula mediante tinción de cristal violeta, se realizó una determinación de la viabilidad celular en la biopelícula, añadiendo la enzima Aii20J, utilizando el ensayo colorimétrico de la resazurina. La resazurina es un colorante azul que se reduce de forma irreversible y proporcional a la respiración aeróbica de las bacterias viables al compuesto fluorescente rojo denominado resorufina. Sin embargo, no se obtuvieron resultados fiables de estos ensayos (datos no mostrados).

En vista de las diferencias encontradas en la producción de AHLs y de motilidad con diferentes medios de cultivo, se probaron los distintos medios para la formación de biopelícula en placas microtiter de 96 pocillos, con y sin enzima Aii20J. Sin embargo, no se consiguieron resultados consistentes debido a la gran variabilidad que presenta el método cuantitativo del cristal violeta en este patógeno. Del mismo modo, se intentó caracterizar la producción de biopelícula de diversos aislados clínicos de *A. baumannii* utilizados en capítulos anteriores (Tabla 1), obteniendo resultados poco repetitivos, aun aumentando el número de réplicas y el tiempo de cultivo de la biopelícula a 48 h.

Aunque los resultados obtenidos parecen sugerir un efecto del QS sobre la formación de biopelícula principalmente en *A. baumannii* ATCC17978, es preciso señalar que las figuras mostradas son representativas de una serie numerosa de experimentos caracterizados por una baja reproducibilidad en los niveles de formación de biopelícula. Esta variabilidad observada dificultó la extracción de conclusiones fiables haciendo necesaria la búsqueda de métodos alternativos para la formación de biopelícula en estas especies.

1.2. Formación de biopelícula en tubos eppendorf y X-CELLigence®

En primer lugar, se probó otro modelo de formación de biopelícula inoculando *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y sus mutantes respectivos de la sintasa de AHLs *abaI* en tubos eppendorf de 1,5 mL con y sin agitación con un volumen total de 1 mL, para observar si en un agitador que permite la rotación de 360° podría aumentar la aireación en la producción de la biopelícula. Además, se añadió la lactonasa de QQ Aii20J para evaluar su posible efecto sobre la producción de biopelícula de estas especies (Figura 51).

Como se muestra en la figura 51, *A. baumannii* ATCC17978 produce menor cantidad de biopelícula en tubos eppendorf en agitación, en los cuales la enzima inhibió por igual la producción de biopelícula en los mutantes de las sintasas de AHLs como en las cepas parentales (Figura 51). Además, *A. nosocomialis* M2 produjo mucha mayor cantidad de biopelícula que *A. baumannii* ATCC17978. En los tubos eppendorf sin agitar, la enzima no pudo contrarrestar en este experimento, la producción de biopelícula en ninguna de las dos especies (Figura 51), probablemente porque tampoco se consiguió formar una biopelícula consistente en los tubos.

La utilización de tubos eppendorf de mayor volumen (5 mL) con 2 mL de medio de cultivo para incrementar la disponibilidad de oxígeno no mejoró la reproducibilidad de los resultados (datos no mostrados).

3. Quorum sensing y formación de biopelícula

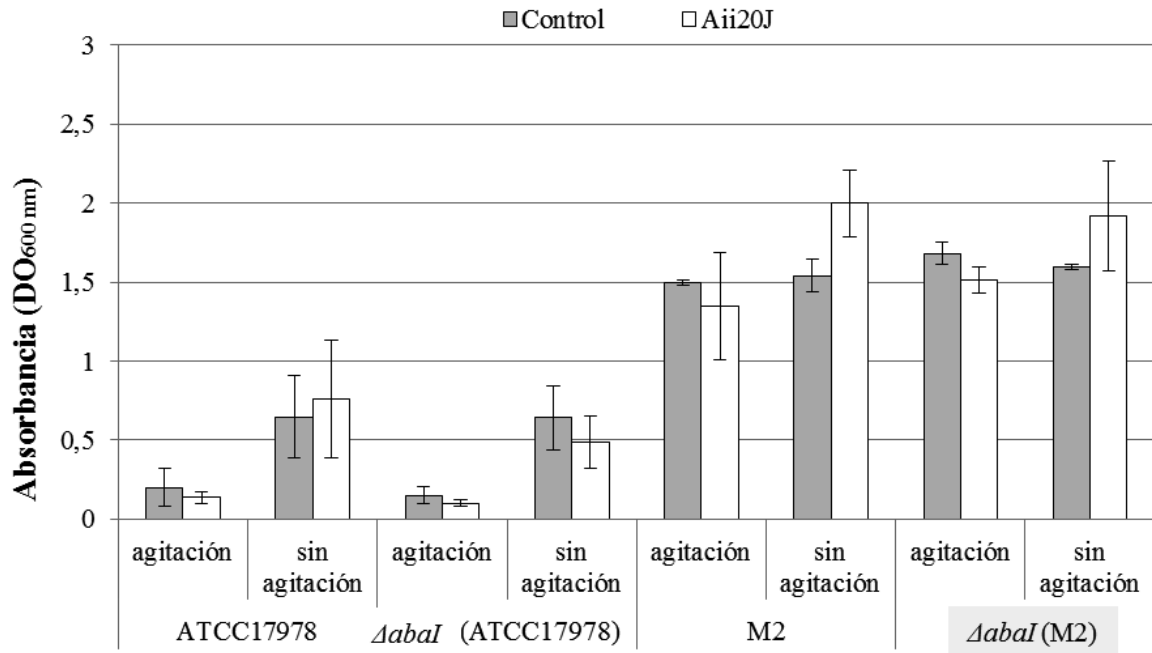


Figura 51. Formación de biopelícula de 24 h en tubos eppendorf de 1,5 mL **A)** con agitación o **B)** con y sin agitación en cultivos de *A. baumannii* ATCC17978, *A. nosocomialis* M2 y de los mutantes de la sintasa de AHLs $\Delta abaI$ (ATCC17978) y $\Delta abaI$ (M2), respectivamente. La biopelícula se cuantificó mediante tinción con cristal violeta. Los datos son la media de 3 cultivos independientes, mostrándose la media y la desviación estándar. Los datos significativos (prueba *t* de Student, $P < 0,05$) se indican con asteriscos.

Además, se probó la capacidad de formación de película (*pellicle*) de *A. baumannii* documentada en la bibliografía como la capa interfase aire-líquido (Nait Chabane et al. 2014a), tanto en tubos de poliestireno como de cristal, en estático o agitación, con distintos medios de cultivo, en luz u oscuridad y a distintas temperaturas (25 y 37°C). Aunque logramos formación de dicha película, no se encontraron diferencias significativas entre *A. baumannii* ATCC17978, el mutante $\Delta abaI$ y *A. nosocomialis* M2 y el método de extracción y cuantificación de la película utilizado no logró representar lo que visualmente observamos (Figura 52), por lo que decidimos no seguir adelante en el estudio de la misma.

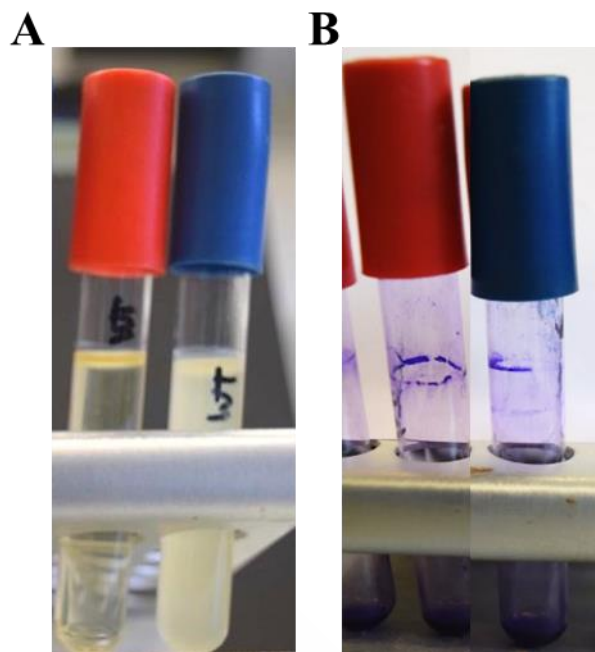


Figura 52. A) Película formada en la interfase aire-líquido de *A. baumannii* ATCC17978 a 25°C (primer tubo por la izquierda) y 37°C (segundo tubo) en medio LB, sin agitación y oscuridad, en este caso. B) la misma película teñida con cristal violeta.

Asimismo, se evaluó la capacidad de formación de biopelícula de *A. baumannii* utilizando el sistema X-CELLigence® (ACEA, Biosciences Inc.). Tampoco se obtuvieron resultados ni siquiera probando distintos volúmenes de medio de cultivo, ya que *A. baumannii* produce la biopelícula principalmente en la interfase líquido-aire y el sistema X-CELLigence solo detecta adhesión al fondo de pocillo, por lo que se descartó este sistema.

1.3. Formación de biopelícula en el sistema BioFlux™

Este sistema permite observar en tiempo real la formación de biopelícula en los microcanales de las placas donde se inoculan las células mediante microscopía. Para determinar si *A. baumannii* forma biopelículas en estas condiciones se realizaron varios ensayos con diferentes inóculos y medios de cultivo con este sistema. Inicialmente se intentó el cultivo de biopelícula inoculando las células a una densidad óptica (600 nm) de 0,05 en LB con baja concentración de sal a 37°C, sin flujo durante 1 hora para permitir la adherencia de las células a la superficie del microcanal y luego con 24 h de flujo 1 dyn/cm². Sin embargo, estas condiciones no permitieron la formación de biopelícula por *A. baumannii*. El siguiente paso fue evaluar otros medios de cultivo incluyendo el RPMI, LB con baja concentración de sal diluido 1/10 y el medio mínimo M9-Tris (Tomaras et al. 2003). Además, se aumentó a 2 horas el tiempo sin flujo para permitir la adherencia celular, se incrementó la densidad óptica inicial a 0,1 y se aumentó el flujo de medio de cultivo a 3 dyn/cm². Las imágenes obtenidas en tiempo real con estas condiciones mostraron formación de pequeños agregados celulares en el medio LB con baja concentración de sal (Figura 53), pero no se obtuvo biopelícula probablemente debido a que la fuerza de adhesión de los clústeres de células recién formados no resistió el flujo de medio en el microcanal.

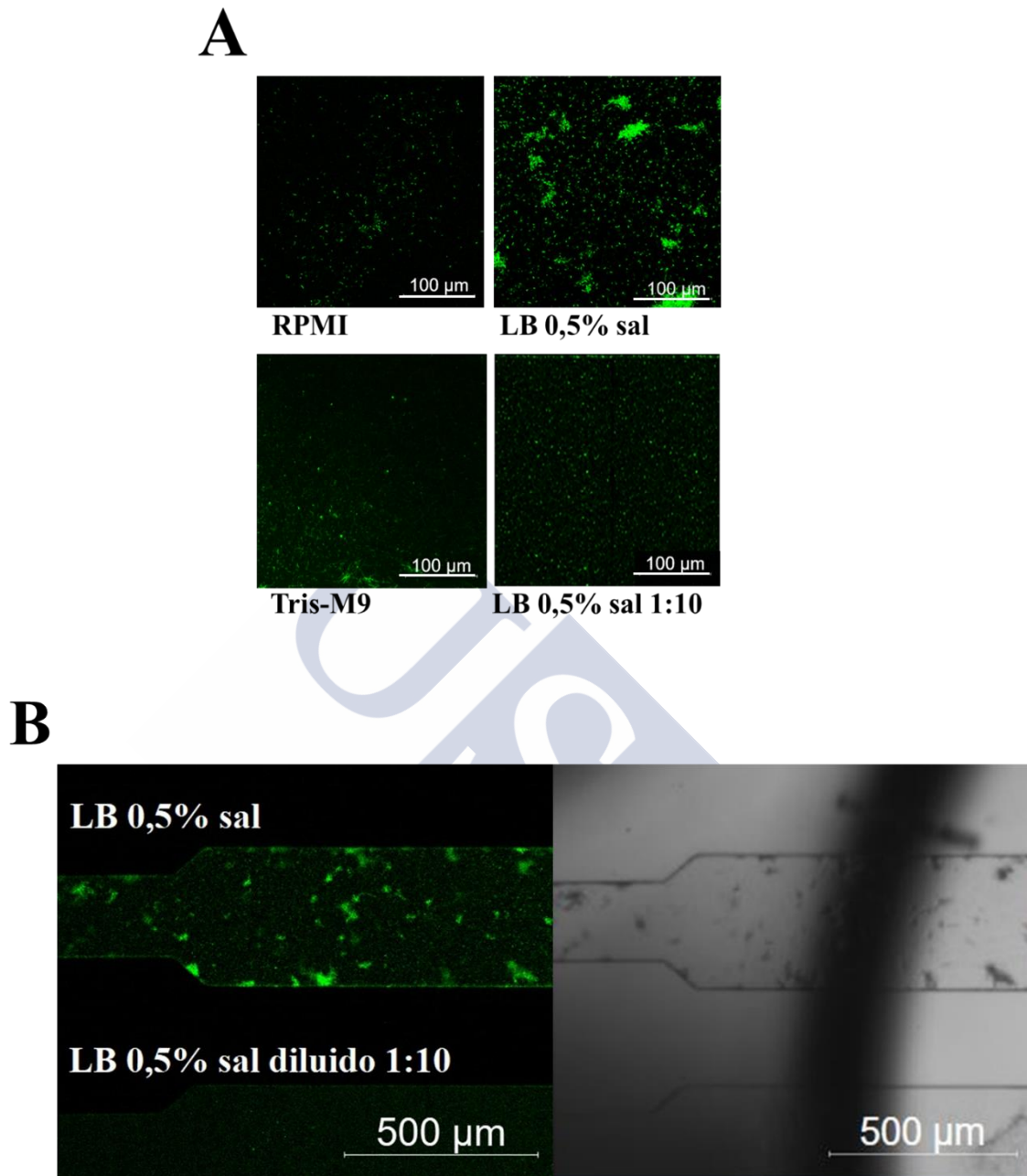


Figura 53. Desarrollo de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 bajo flujo continuo en el sistema BioFlux™ tras 24 h de experimento. **A)** Biopelícula formada en los microcanales del sistema con los distintos medios de cultivo: medio RPMI, LB con baja sal (0,5%), medio Tris-M9 y LB con baja sal diluido 1:10. La imagen fue tomada con un objetivo 40X **B)** En la imagen (tomada a 5X) se muestran los microcanales en LB con baja sal y LB con baja sal diluido 1:10. Para teñir las células se utilizó la tinción SYTO9®.

Además, mediante la observación al microscopio pudimos observar dos tipos bien diferenciados de células: el primero de ellos en el microcanal donde las células de *Acinetobacter* se adhieren individualmente o formando agregados irregulares y el segundo, en el fondo del pocillo y especialmente en la película que se forma en la parte superior del pocillo en contacto con el aire, donde las células se agregan formando estructuras filamentosas alargadas (Figura 54).

LB 0,5% sal

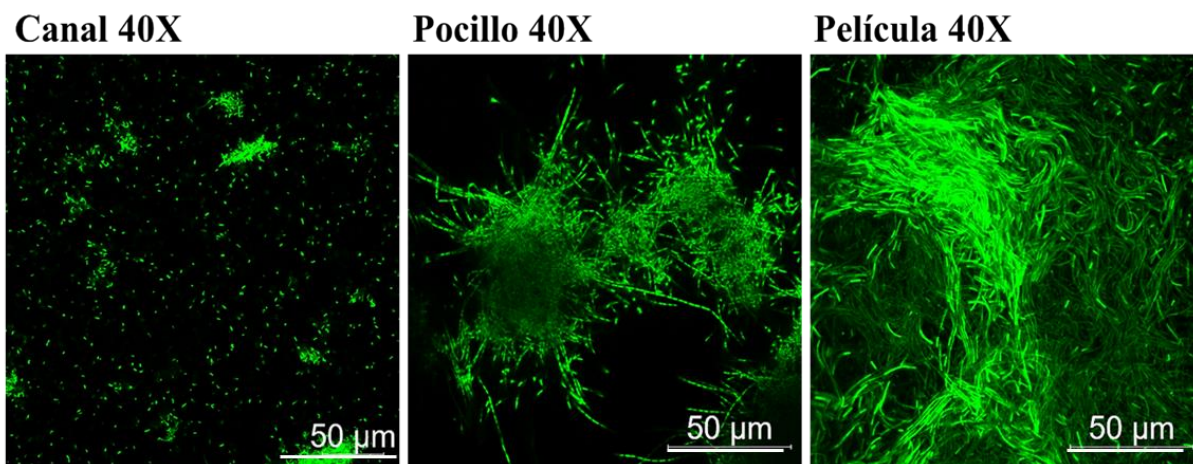


Figura 54. Imágenes al microscopio confocal a 40x de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 en el canal del BioFlux™ (izquierda), en el pocillo (medio) y en la película (interfase aire-líquido). El fluoróforo SYTO9® se añadió al inicio del ensayo para poder observar las células mediante fluorescencia.

Adicionalmente, se realizó otro ensayo en el sistema BioFlux™ reduciendo el flujo con la misma densidad óptica (0,1) de inóculo en medio LB con baja sal, sin una mejora en los resultados obtenidos. Y por último, en estas condiciones, se evaluó en otro ensayo el medio de cultivo Mueller-Hinton, ya que artículos previos en la bibliografía describían la capacidad de *Acinetobacter* de formar biopelícula en este medio de cultivo en el borde del canal del BioFlux™ (Nait Chabane et al. 2014b). Sin embargo, no conseguimos mejor resultado que el que se muestra en la figura 53.

1.4. Ensayo de adherencia celular

Con el objetivo de evaluar las primeras etapas de la colonización de una superficie, ya que es el paso previo a formación de biopelícula, se observó en tiempo real la adherencia de células de *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante de la sintasa de AHLs *abaI*. Dado que los mayores agregados celulares en el sistema de flujo continuo (BioFlux™) se alcanzaron en LB con baja concentración de sal, las células de *A. baumannii* se inocularon a una densidad óptica de 0,01, por duplicado, en una placa de 6 pocillos con este medio, a 37°C, durante 72 horas. Además, la enzima de QQ Aii20J se añadió para investigar el efecto del QQ en la adherencia de las células a la superficie. En este experimento se tomaron fotografías cada 15 segundos con una cámara acoplada a una lente de microscopio (68x) con las que se generó un video. Como resultado, no se observó adherencia a superficie en ninguna de las condiciones evaluadas. Sin embargo, los videos generados mostraron que con el tiempo aparecen unos agregados con forma de estrella en todas las condiciones (Figura 55), pero con diferencias en el tiempo entre ellas. De este modo, en ATCC17978 aparecen horas antes (a las 06:28 h) que en el mutante de la sintasa de AHLs (10:00 h). La adición de la enzima de QQ no tuvo efecto sobre la formación de estos agregados.

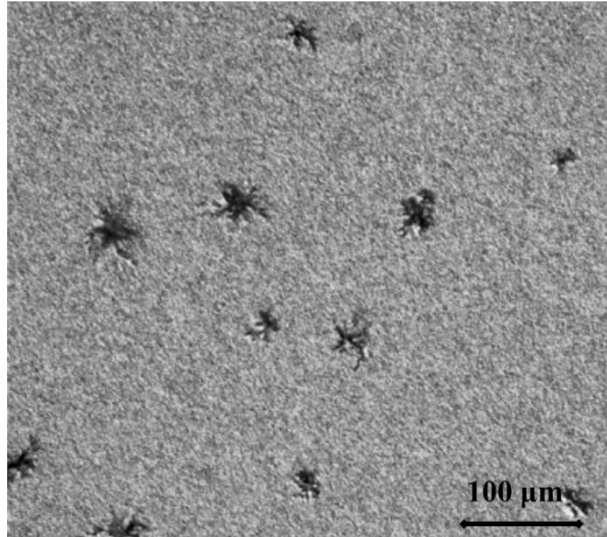


Figura 55. Agregados de estructura estrellada formados en el ensayo de adherencia celular por *A. baumannii* ATCC17978 en medio LB con bajo porcentaje de sal (0,5%) y a 37°C.

2. Formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 en un biorreactor de interfase

Debido a la observación de la gran necesidad de oxígeno de *A. baumannii* ATCC17978 para la formación de biopelícula, se utilizó un nuevo sistema (Biorreactor de biopelícula bacteriana de interfase) que maximiza el contacto de la biopelícula con el aire, con inmersión y emersión constante de las superficies colonizadas por las células en el medio de cultivo. Como resultado, en el nuevo biorreactor se consiguió desarrollar una biopelícula consistente y de elevado grosor en los últimos días del ensayo (hasta 0,5 mm de espesor) en *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 56A).

A



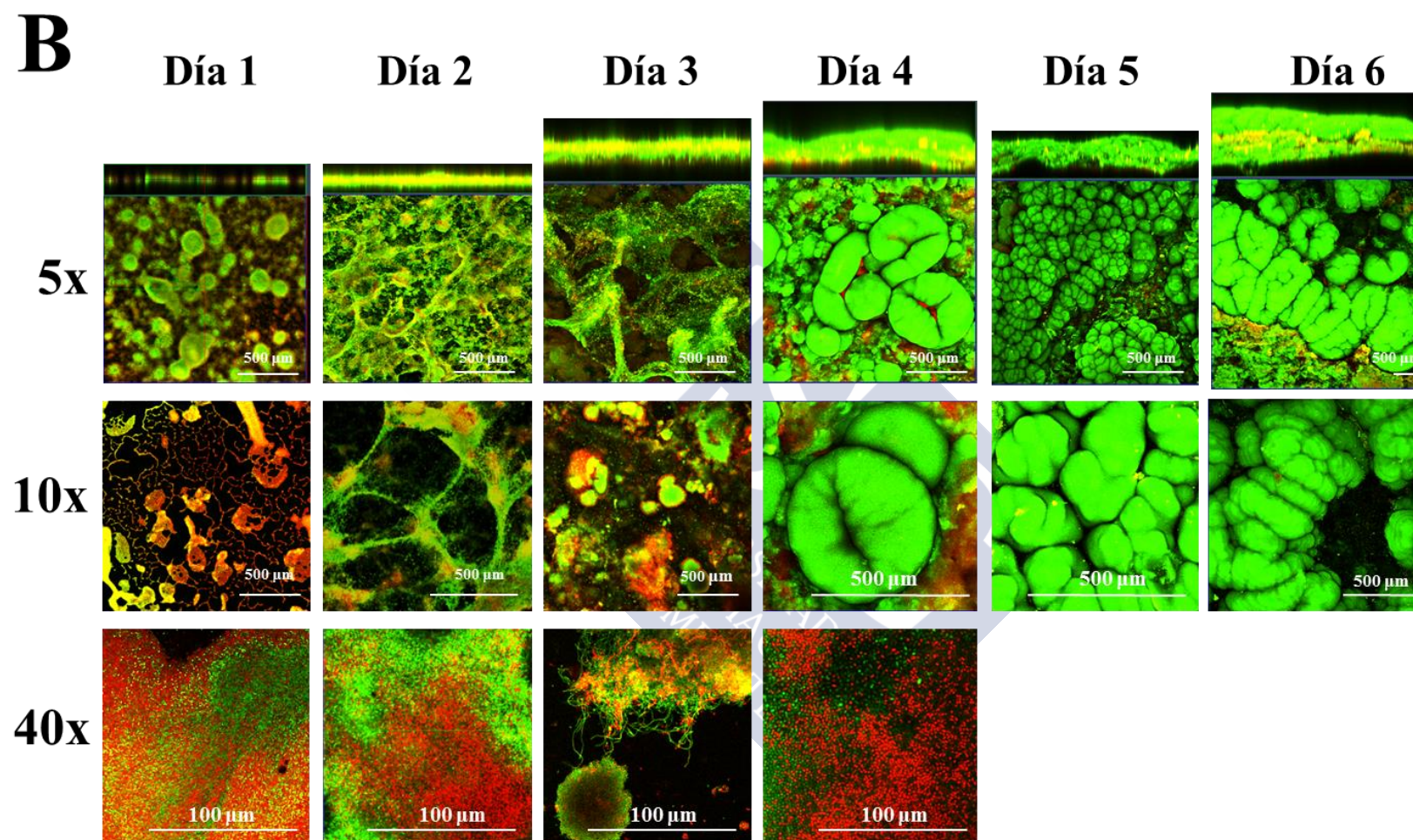


Figura 56. Biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 formada en el biorreactor de biopelícula a 37°C en LB con baja sal (0,5%) durante 6 días. **A)** Fotografía de la biopelícula desarrollada sobre un portaobjetos correspondiente al día 4. **B)** Desarrollo de la biopelícula en cubreobjetos a lo largo del tiempo. Las imágenes son representativas de varios experimentos independientes y se tomaron con un microscopio confocal de fluorescencia (a 5x, 10x y 40x) tras teñir las células con SYTO9® y yoduro de propidio.

3. Quorum sensing y formación de biopelícula

Como se observa en la figura 56B, *A. baumannii* ATCC17978 comienza a crecer formando un entramado de células (día 1 y 2) que se apilan concéntricamente hasta formar agregados circulares en el día 3, que en el cuarto día se convierten en formas esféricas con aspecto de melocotón, por presentar una división irregular en forma de hendidura, que se distribuyen aleatoriamente por toda la superficie. Estas esferas están completamente recubiertas por células vivas (teñidas de verde) salvo en la parte inferior o basal donde se sitúan células muertas (células rojas) (Figuras 56 y 57). Las esferas se encuentran vacías en su interior y se agrupan formando hileras de esferas continuas (día 4), que acaban apilándose y cubriendo toda la superficie (día 5 y 6). A partir del día 6 las esferas comienzan a abrirse desde el punto central y a despegarse posiblemente para dispersarse con el objetivo de colonizar otra superficie. Utilizando una tinción para observar ADN y membrana celular, observamos que las estructuras con aspecto de melocotón aparecen rodeadas de ADN (en azul) (Figura 57C).

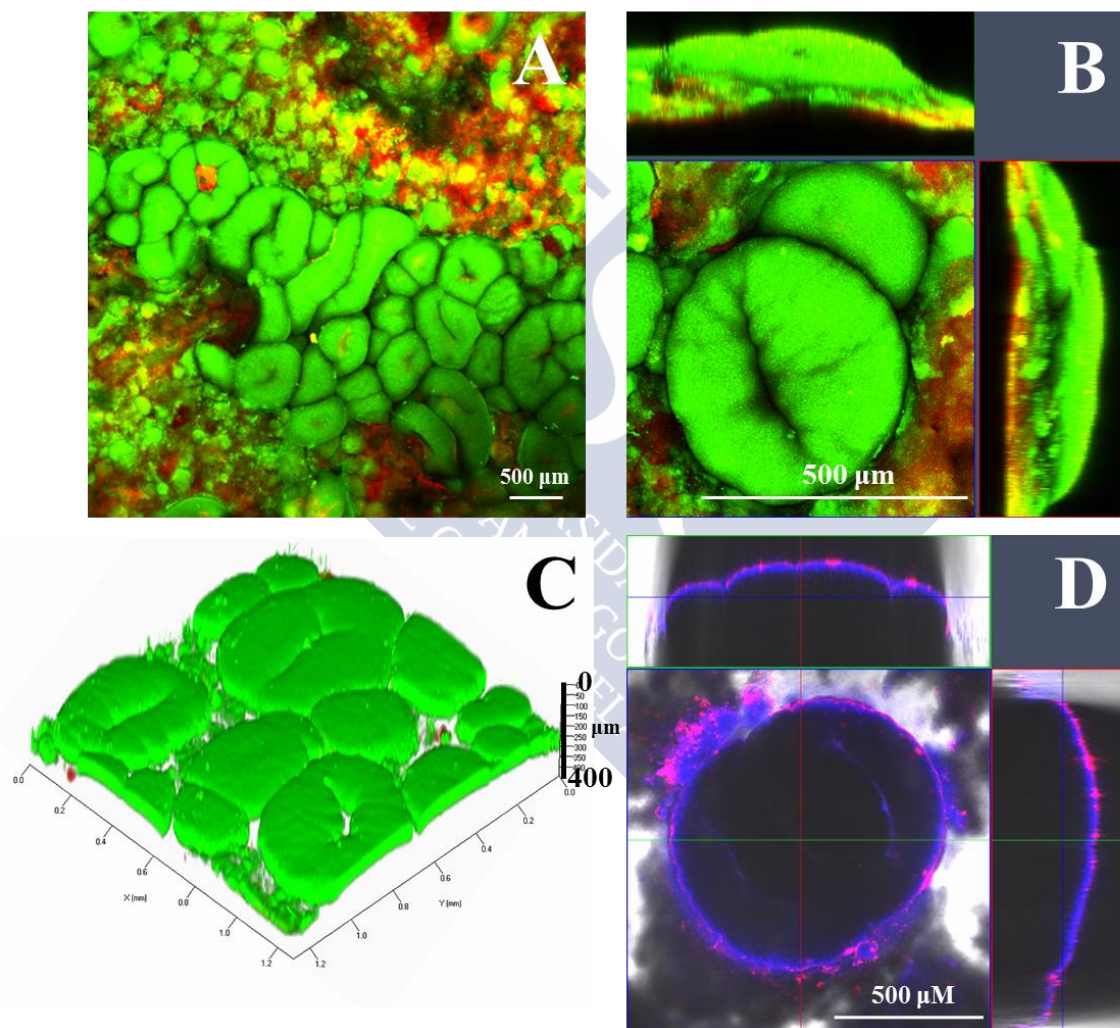


Figura 57. Conjunto de estructuras esféricas con aspecto de melocotón de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 conseguida con el biorreactor de biopelícula tomadas al microscopio confocal. **A)** Imagen tomada el día 4, a 5x, teñida con SYTO9® (verde) y ioduro de propidio (rojo). **B)** Imagen tomada el día 5, a 5x, de una de las esferas de la biopelícula teñida con SYTO9® y ioduro de propidio. **C)** Conjunto de esferas formadas en la biopelícula en una imagen tridimensional (día 5, a 5x) de la superficie teñida con SYTO9® y ioduro de propidio. Como se aprecia en la imagen, la biopelícula presenta mayor número de células vivas en las capas superiores. **D)** Imagen tomada el día 6 a 10x de una de las esferas de la biopelícula teñida con YOYO (azul) y FM4-64 (rojo).

2.1. Biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 y del mutante $\Delta abal$

Una vez comprobado que *Acinetobacter* formaba biopelículas de forma robusta y reproducible en este nuevo sistema y tras la caracterización de las fases de formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 a lo largo de los días, decidimos analizar si el mutante de las sintasas de AHLs formaba la biopelícula del mismo modo, con el objetivo de estudiar si existía efecto del QS sobre la formación de biopelícula en este patógeno y en qué fases se veía esta formación más afectada.

A simple vista y en comparación con la cepa salvaje, el mutante $\Delta abal$ desarrolló mucha menos biopelícula cubriendo además menor superficie que la cepa parental (Figura 58).

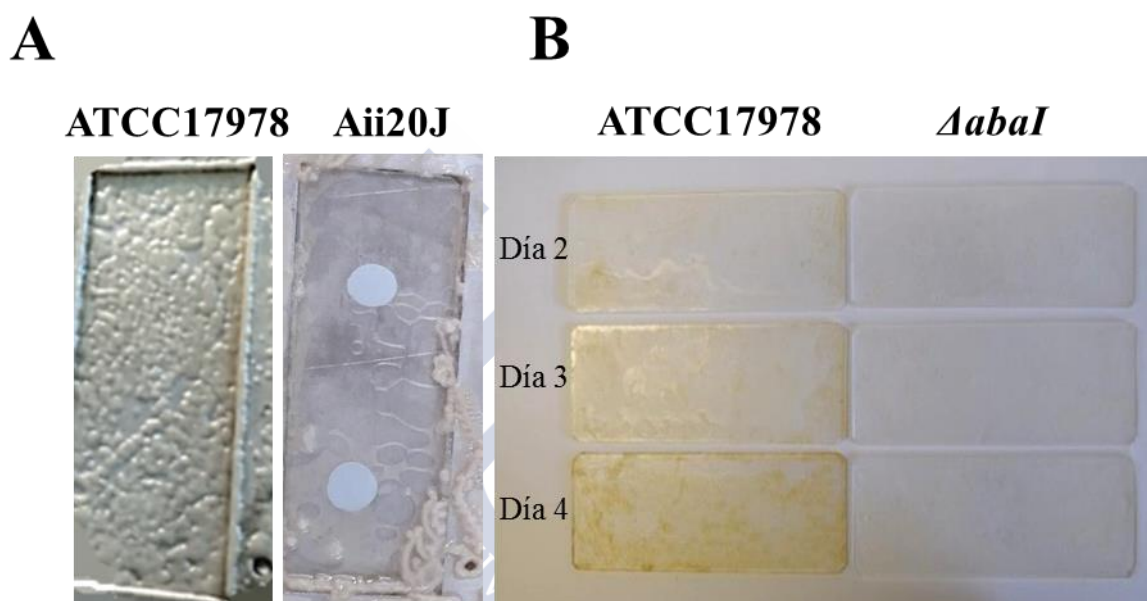


Figura 58. A) Biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 y $\Delta abal$ desarrollada tras 4 días en el nuevo biorreactor de biopelícula. B) Comparación visual de la biopelícula correspondiente a los días 2, 3 y 4, en los portaobjetos secados para su pesado de *A. baumannii* ATCC17978 (izquierda) y $\Delta abal$ (derecha). La biopelícula de *Acinetobacter* se vuelve de color amarillento con el tiempo.

Estos resultados fueron corroborados tras el pesado diario de portaobjetos secos (Figura 59). A partir del tercer día, el peso de la biopelícula del mutante $\Delta abal$ fue significativamente menor, indicando un papel clave de las AHLs en el desarrollo de biopelícula en este patógeno.

3. Quorum sensing y formación de biopelícula

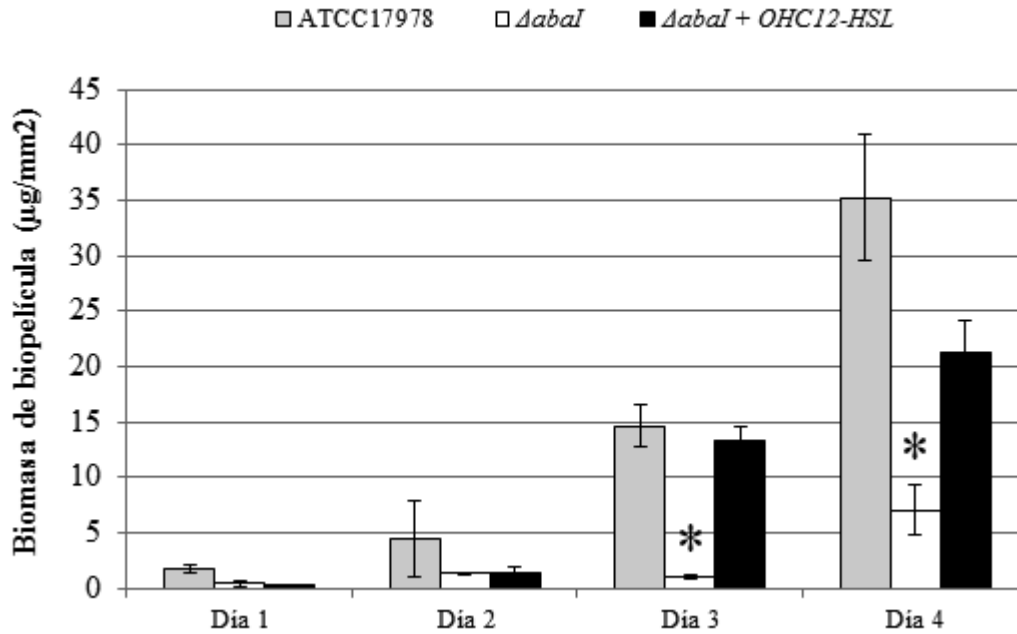


Figura 59. Biomasa de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, de $\Delta abaI$ y de $\Delta abaI$ suplementado con OHC12-HSL (10 μ M) cada día en el nuevo biorreactor de biopelícula. Se muestran las medias de dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno y las desviaciones estándar. Los asteriscos indican la significación frente al control de ATCC17978 (prueba *t* de Student, $P < 0,05$).

En cuanto a la observación microscópica de la biopelícula, el mutante de las AHLs presentó una capa más fina con mayor número de células muertas (teñidas en rojo) y de menor grosor que su cepa parental (Figuras 60, 61, 62 y 63). La biopelícula de este mutante no forma una capa continua sobre la superficie, sino que se forman agregados aislados, especialmente el último día del ensayo (día 4) (Figura 63), en contraste con el entramado más uniforme constituido por hileras de esferas formado por *A. baumannii* ATCC17978, aunque en número menor, tras tres días de cultivo también aparecen en el mutante las estructuras esféricas que observábamos en la cepa parental. Sin embargo, éstas son esferas mucho más perfectas y simétricas, con la hendidura, si la tiene, situada en el centro de la misma, y permanecen aisladas en la superficie sin recubrirla por completo, al contrario de lo que ocurre en la cepa parental (Figuras 60, 61 y 63).

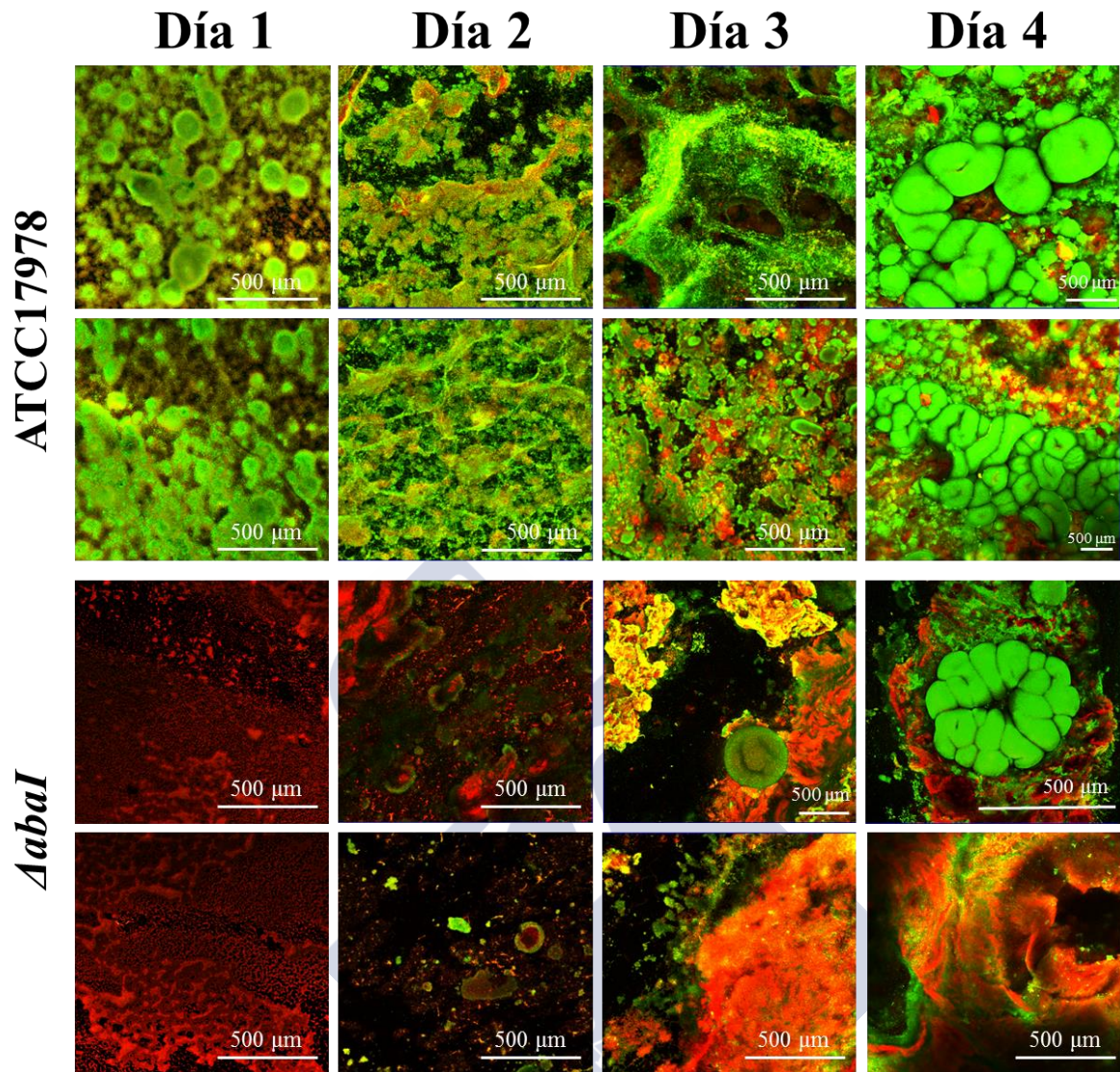


Figura 60. Imágenes tomadas al microscopio confocal (5x) de la biopelícula desarrollada durante 4 días en el biorreactor de biopelícula por *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante *Δabal*. Las células se tiñeron con SYTO9® (verde) y ioduro de propidio (rojo) para diferenciar células vivas de células muertas. Las imágenes tomadas (dos por día de ATCC17978 o *Δabal*) son representativas de 4 experimentos consecutivos realizados de manera independiente.

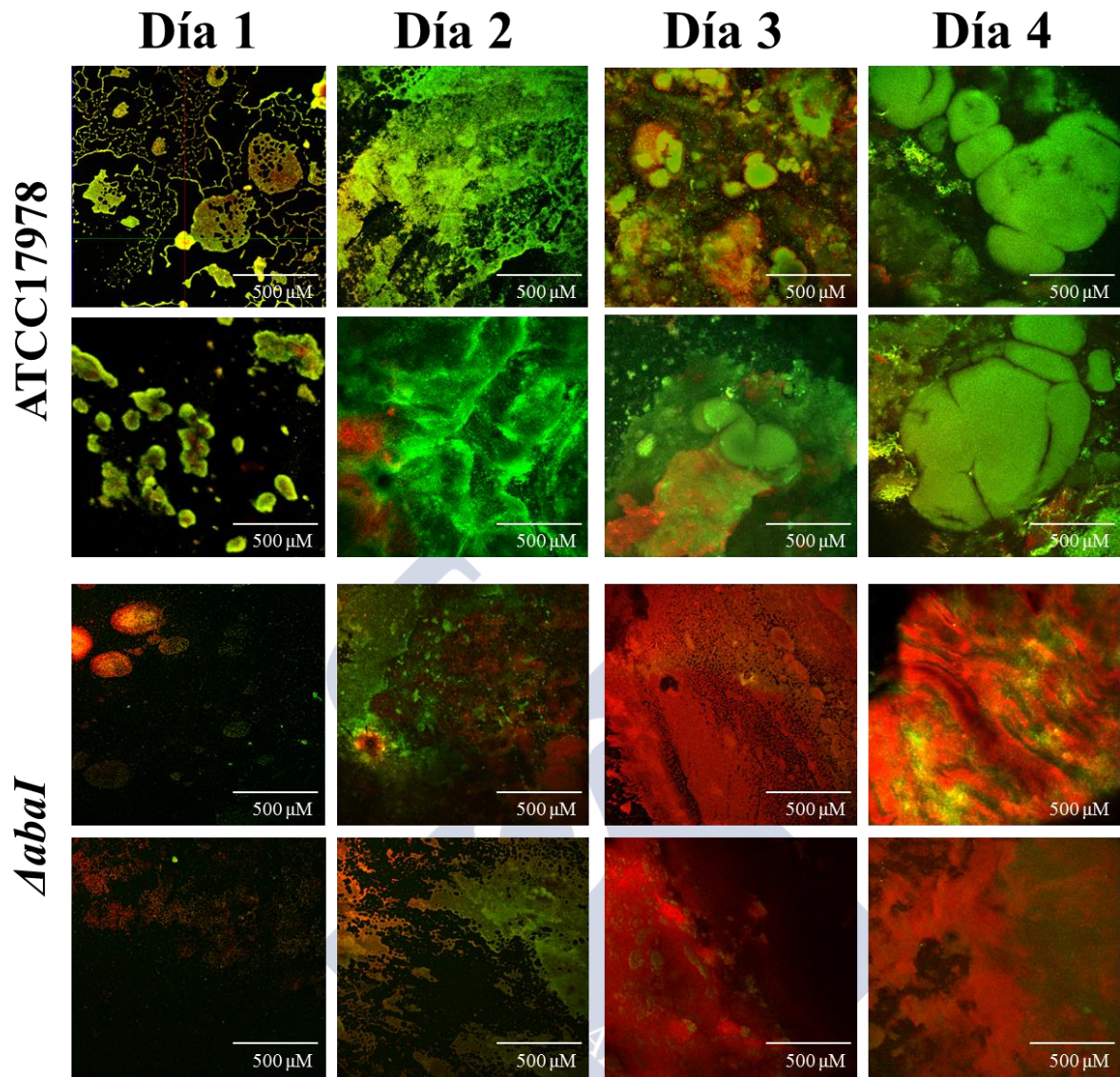


Figura 61. Imágenes tomadas al microscopio confocal (10x) de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante *Δabal* desarrollada durante 4 días en el biorreactor de biopelícula. Las células se tiñeron con SYTO9® (verde) y yoduro de propidio (rojo) para diferenciar células vivas de células muertas. Las imágenes tomadas (dos por día de ATCC17978 o *Δabal*) son representativas de 4 experimentos consecutivos realizados de manera independiente.

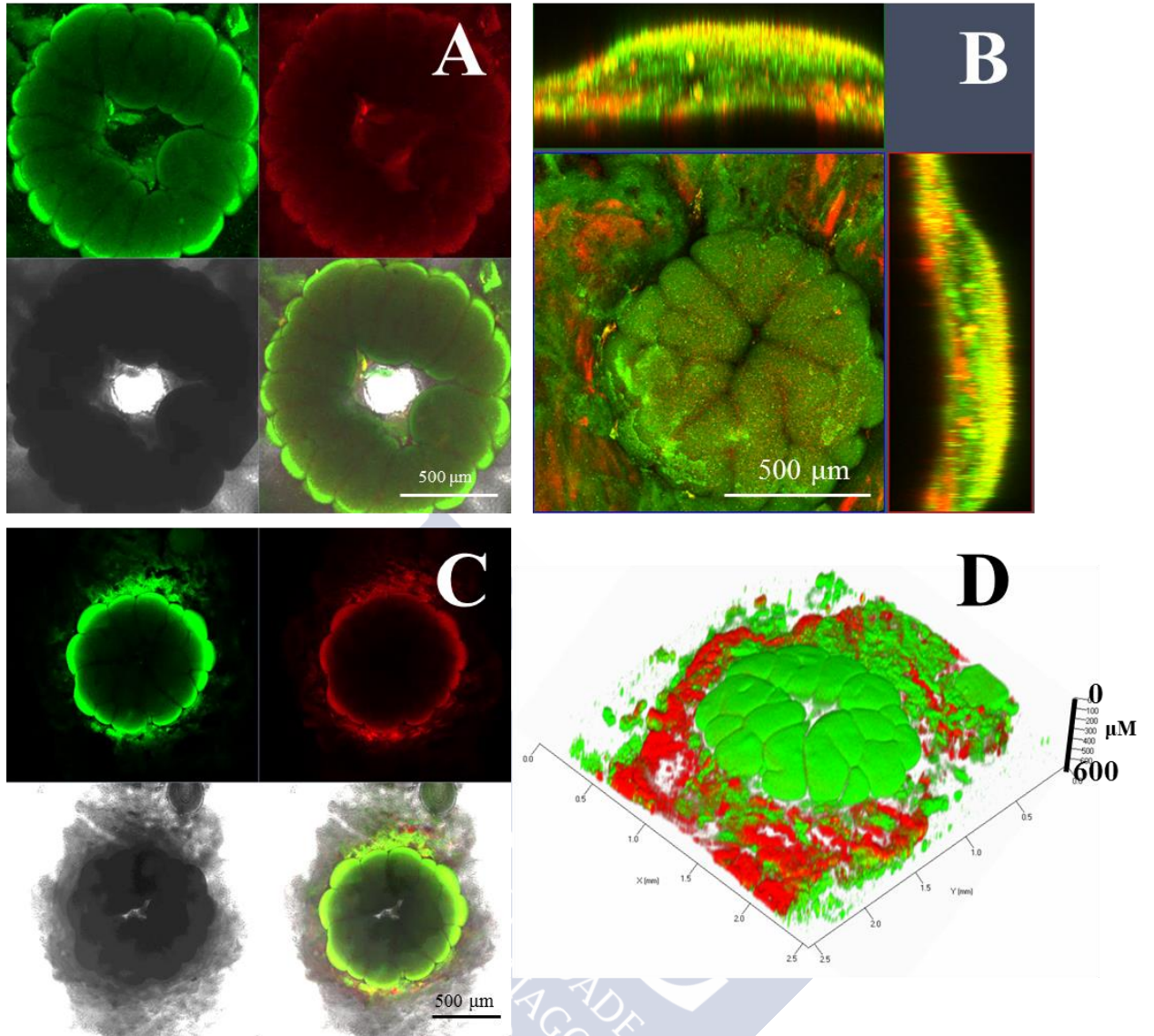


Figura 62. Conjunto de estructuras esféricas encontradas en la biopelícula del mutante $\Delta abal$ de *A. baumannii* ATCC17978 con el biorreactor de biopelícula. Las células se tiñeron con SYTO9® (verde) y yoduro de propidio (rojo) para diferenciar células vivas de células muertas al microscopio confocal. **A y B)** Imágenes tomadas el día 3, a 5x. **C y D)** Imágenes tomadas el día 4, a 5x, de la misma esfera de la biopelícula representada con los canales de fluorescencia por separado y en figura tridimensional. En la fotografía se puede apreciar mayor número de células muertas (en rojo) rodeando la esfera.

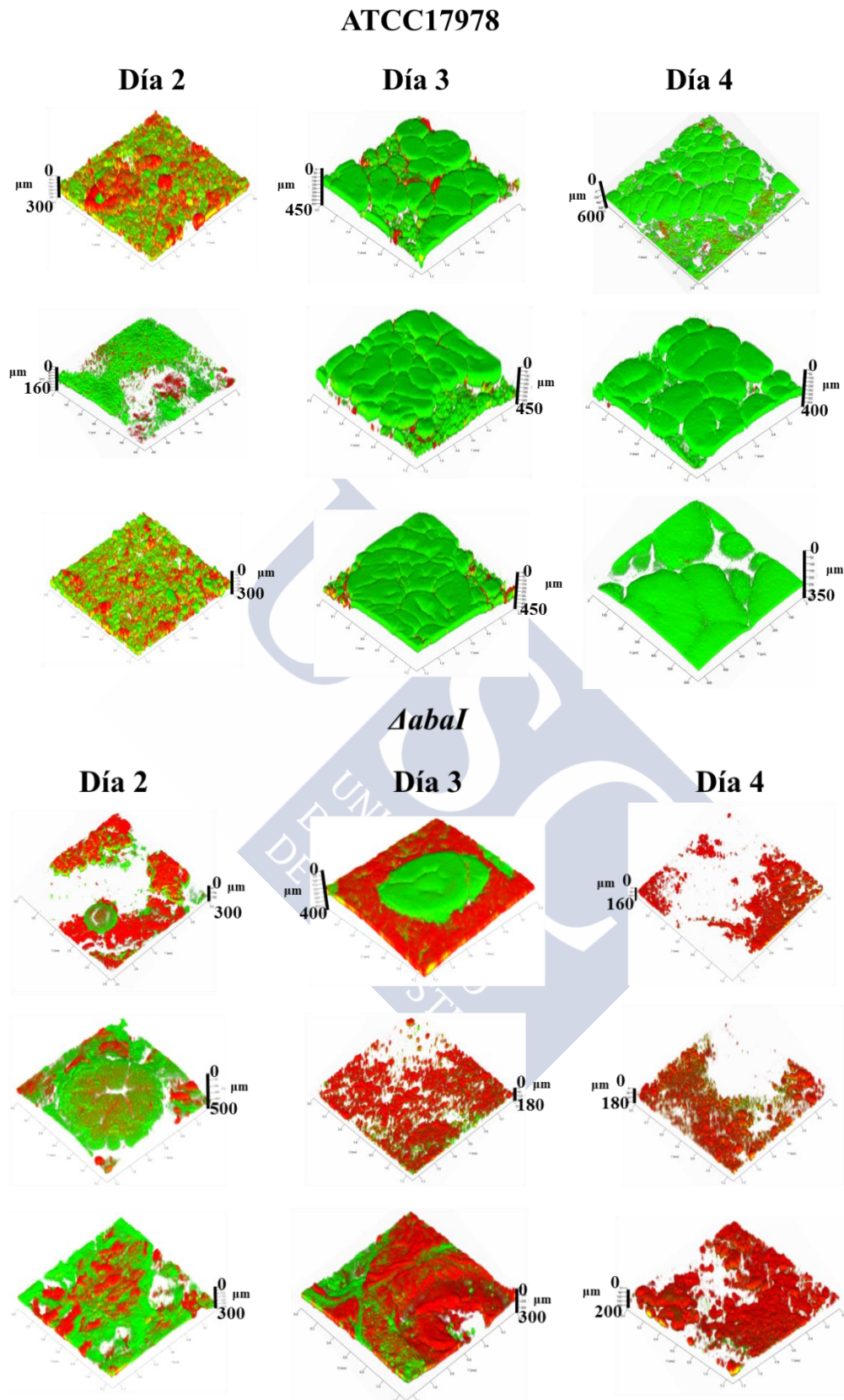


Figura 63. Comparativa de la superficie tridimensional obtenida con microscopía confocal de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante $\Delta abal$ en el biorreactor. Las imágenes se escogieron aleatoriamente y son representativas de la superficie de los cubreobjetos correspondientes al día 2, 3 y 4 del experimento (5x). Las células de la biopelícula se tiñeron con SYTO9® (en verde) y yoduro de propidio (en rojo) para distinguir las células vivas de las células muertas, respectivamente.

Además de la tinción de células vivas/células muertas, se utilizaron otras dos tinciones de manera conjunta para visualizar ADN y membrana celular (YOYO y FM4-64, respectivamente). Como observamos en la figura 64, en la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 se libera una gran cantidad de ADN de las células a la matriz de la biopelícula, en general de manera proporcional a la cantidad de biopelícula, por lo que con el paso del tiempo se observa mayor ADN extracelular, que aparece formando redes y conexiones entre distintos puntos de la biopelícula, posiblemente aportando consistencia al entramado de la misma. Por otro lado, con la tinción FM4-64 (en rojo) se puede visualizar las membranas celulares, así como el exopolisacárido de la matriz de la biopelícula de *A. baumannii* (Figura 64). En relación al mutante de la sintasa de AHLs, no se observaron cambios significativos en la tinción lipófila (Figura 64), tan solo en las imágenes aparecía menor cantidad en general de ambas señales fluorescentes debido en gran parte a la menor formación de biopelícula mencionada. En cuanto a la liberación de ADN, solo observamos ligeramente mayor cantidad de dicha red o nebulosa el día 4 en la biopelícula de ATCC17978 frente a la del mutante. Cabe añadir, que el mutante Δ *abaI* presentó mayor señal lipófila que la cepa parental en los últimos días (Figura 64), que podría explicarse por el mayor número de restos celulares de las células muertas observadas en las figuras 60 y 61.



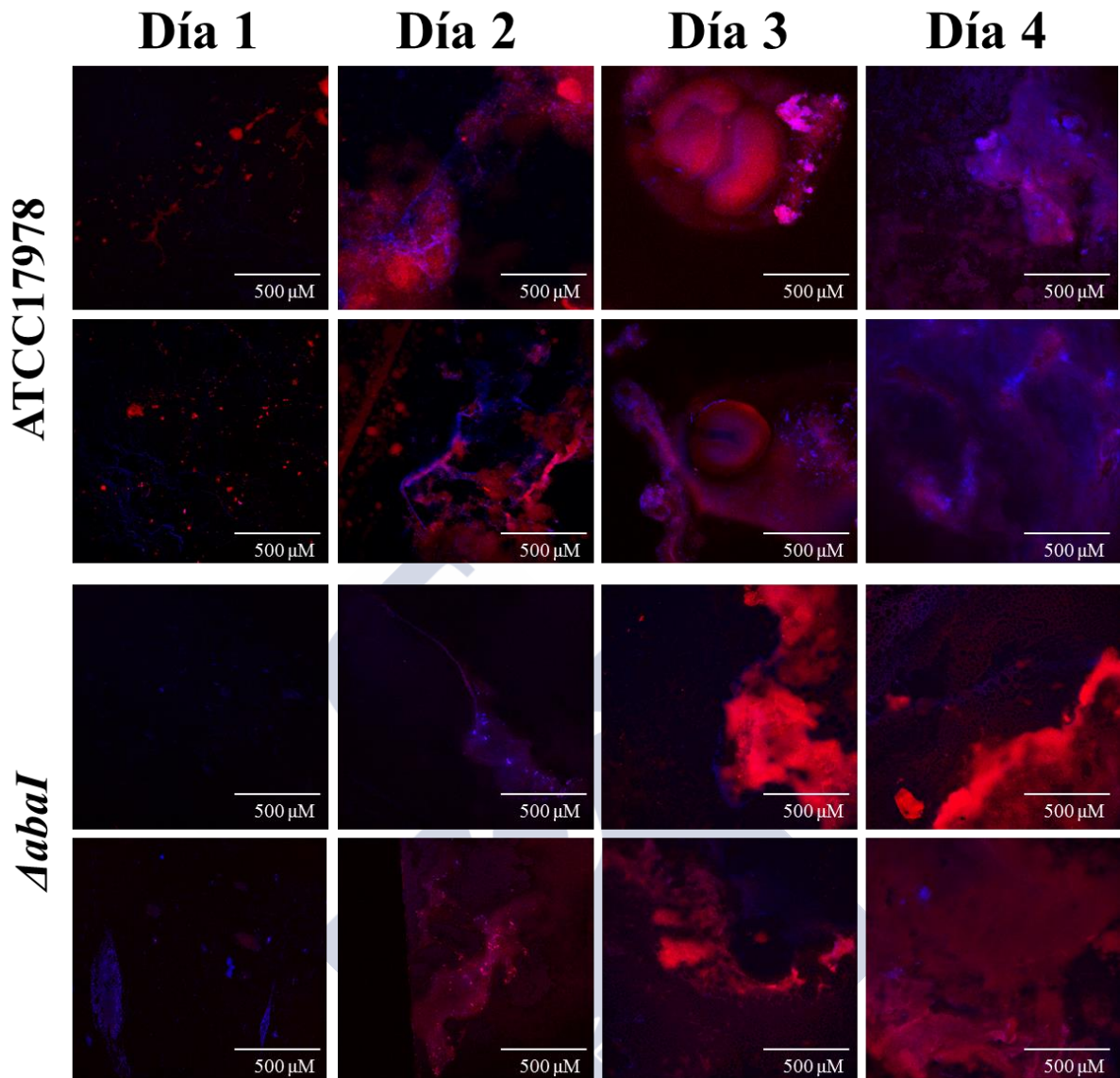


Figura 64. Imágenes tomadas al microscopio confocal (10x) de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 y el mutante $\Delta abal$ desarrollada durante 4 días en el biorreactor de biopelícula. Las células se tiñeron con YOYO (azul) y FM4-64 para diferenciar ADN de la membrana celular. Las fotografías son representativas de 4 ensayos distintos e independientes realizados de manera consecutiva.

2.2. Suplementación de la biopelícula con la OHC12-HSL

Una vez observada la necesidad del QS para desarrollar biopelícula consistente y uniforme, se evaluó la suplementación de la biopelícula del mutante de la sintasa de AHLs *abaI* con la AHL mayoritaria de *A. baumannii* ATCC17978, la OHC12-HSL, en el nuevo biorreactor de biopelícula. De este modo, cada día junto con el medio fresco se añadió la AHL de nuevo.

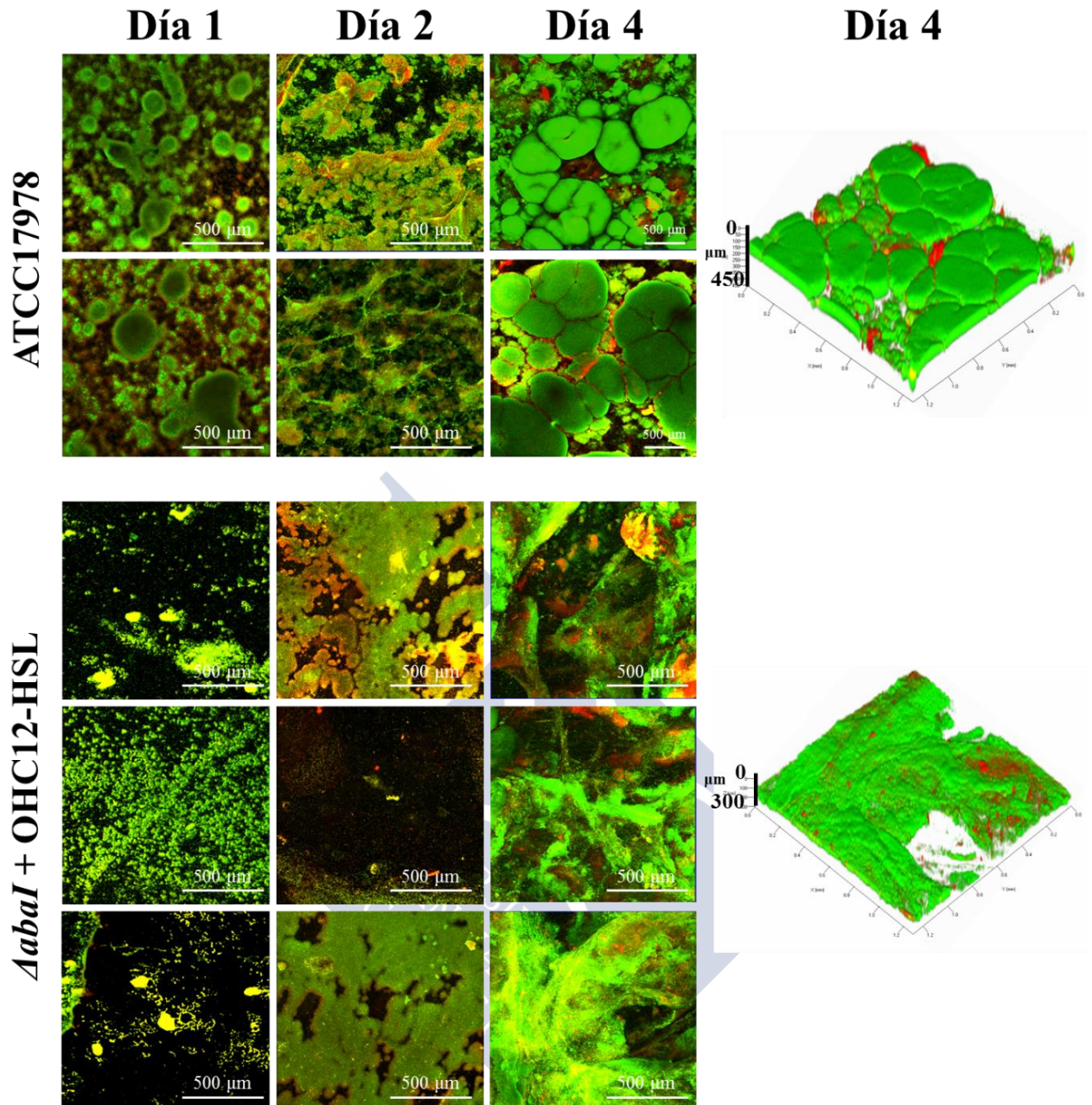


Figura 65. Fotografías tomadas al microscopio confocal (5x) de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 y del mutante $\Delta abal$ suplementada con OHC12-HSL (10 μM), desarrollada en el biorreactor a distintos días (1, 2 y 4) (izquierda) y representación tridimensional del día 4 (derecha). Las células se tiñeron con SYTO9® (verde) e yoduro de propidio (rojo) para distinguir células vivas de células muertas. Las imágenes de la suplementación con la OHC12-HSL son representativas de 2 ensayos independientes y consecutivos.

La suplementación del mutante de la sintasa de AHLs con OHC12-HSL, resultó en una recuperación considerable de la biopelícula (Figura 65). En el biorreactor se desarrolló una biopelícula más semejante a la que forma la cepa parental, es decir, una biopelícula constituida en una masa más uniforme y aunque no presentó las esferas con aspecto de melocotón de ATCC17978 ni las esferas perfectas del mutante $\Delta abal$, se produjo un aumento de la superficie recubierta por la biopelícula detectable a simple vista. A nivel microscópico, la adición de la AHL ayudó a formar una biopelícula más consistente con un incremento del número de células vivas (Figura 65), en comparación con el mutante solo (Figuras 60 y 61) llegando a alcanzar las 300 μm de espesor en

comparación con las casi 500 μm de ATCC17978 (Figura 65). Cabe añadir, que en determinados puntos *A. baumannii* produjo una capa de biopelícula de entre 600 y 700 μm al quinto día, mientras que en el mutante el grosor de la biopelícula no sobrepasó en general las 200 μm exceptuando los puntos coincidentes con las pocas esferas aisladas (datos no mostrados). El peso de la biopelícula confirmó la recuperación de al menos el 50% de biopelícula en el último día del ensayo (Figura 59), confirmando el papel clave del QS en el desarrollo normal de la biopelícula de *A. baumannii*.

2.3. Efecto del QQ sobre la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978

Tras establecer la importancia del QS mediado por AHLs en la producción de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, siendo éstas necesarias para el correcto desarrollo de la misma, se determinó si la enzima de QQ Aii20J utilizada a lo largo de todo este trabajo afectaba o no a la producción y/o estructura de la biopelícula.

Debido a la limitación de la cantidad de la enzima purificada necesaria para utilizarla en el biorreactor a una concentración activa, se decidió añadir en su lugar el extracto celular de *Escherichia coli* BL21(DE3)plysS con Aii20J sobre-expresada. Esta cepa de *E. coli* fue la utilizada para la subclonación y posterior purificación de la enzima Aii20J (Mayer et al. 2015). El extracto de *E. coli* transformado con Aii20J fue añadido cada día con el medio de cultivo a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control se utilizó el extracto de *E. coli* transformado con el plásmido utilizado sin la enzima. Además, se comprobó la pureza de Aii20J en el extracto mediante electroforesis (Figura 66) y la actividad QQ de ambos mediante bioensayo de inhibición de violaceína (Figura 67).

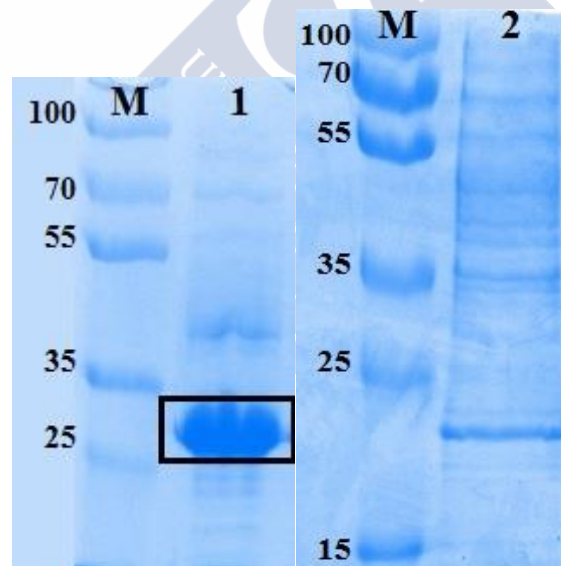


Figura 66. Gel de electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de coomasie del extracto celular de cultivos de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con pET28c(+)-*aai20J* o con pET28c(+) e inducidos con IPTG (1 mM). M: Marcador molecular (en kDa), calle 1: extracto celular obtenido tras sonicar, centrifugar y filtrar (0,20 μm), calle 2: extracto celular control sin el inserto de *aai20J* tratado de la misma manera. La banda de Aii20J correspondiente aparece enmarcada en el recuadro.

Como se observa en el gel de la figura 66, la banda de la proteína aparece sobre-expresada claramente en el tamaño correspondiente en los cultivos transformados con pET28c(+)-*aai20J*, por debajo de la banda del marcador molecular de 35 kDa, en el tamaño esperado (~32,8 kDa). Al realizar el extracto celular de Aii20J e inducir mediante IPTG, el extracto celular aparece con menos proteínas que las que se detectan

en el extracto transformado con el plásmido sin el inserto de *aii20J*, obteniéndose la proteína más limpia y confirmando el grado de pureza de Aii20J en el extracto. El extracto control aparece sin la proteína Aii20J (Figura 66). Además, el extracto de *E. coli* transformado con Aii20J presentó capacidad de degradación de señales de QS frente al extracto control (Figura 67).



Figura 67. Degradación de C12-HSL (10 μ M) por el extracto de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con pET28c(+) sin el inserto de *aii20J* o con pET28c(+)-*aii20J* e inducidos con IPTG (1 mM), mediante bioensayo de inhibición de producción de violaceína en medio sólido con el biosensor de *C. violaceum* VIR07, tras 24 h de exposición con la señal. El PBS (pH 6,7) suplementado con C12-HSL a la misma concentración se usó como control negativo.

Visualmente se observó una disminución clara del recubrimiento de la superficie de la biopelícula al añadirle el extracto de Aii20J con actividad QQ en comparación con el extracto control sin el inserto de Aii20J y con la condición sin extracto (Figura 68). En presencia de la enzima se formó biopelícula de igual espesor pero mucho más esponjosa, resultando en una masa mucho más deshinchada microscópicamente. Las esferas con aspecto de melocotón que observábamos en *A. baumannii* ATCC17978 no aparecieron en ningún momento a lo largo de los cuatro días. Solo se desarrollaron grandes hileras de agregados celulares que se amontonaron principalmente en las zonas más oxigenadas, como los bordes y esquinas de los portaobjetos (Figura 68).

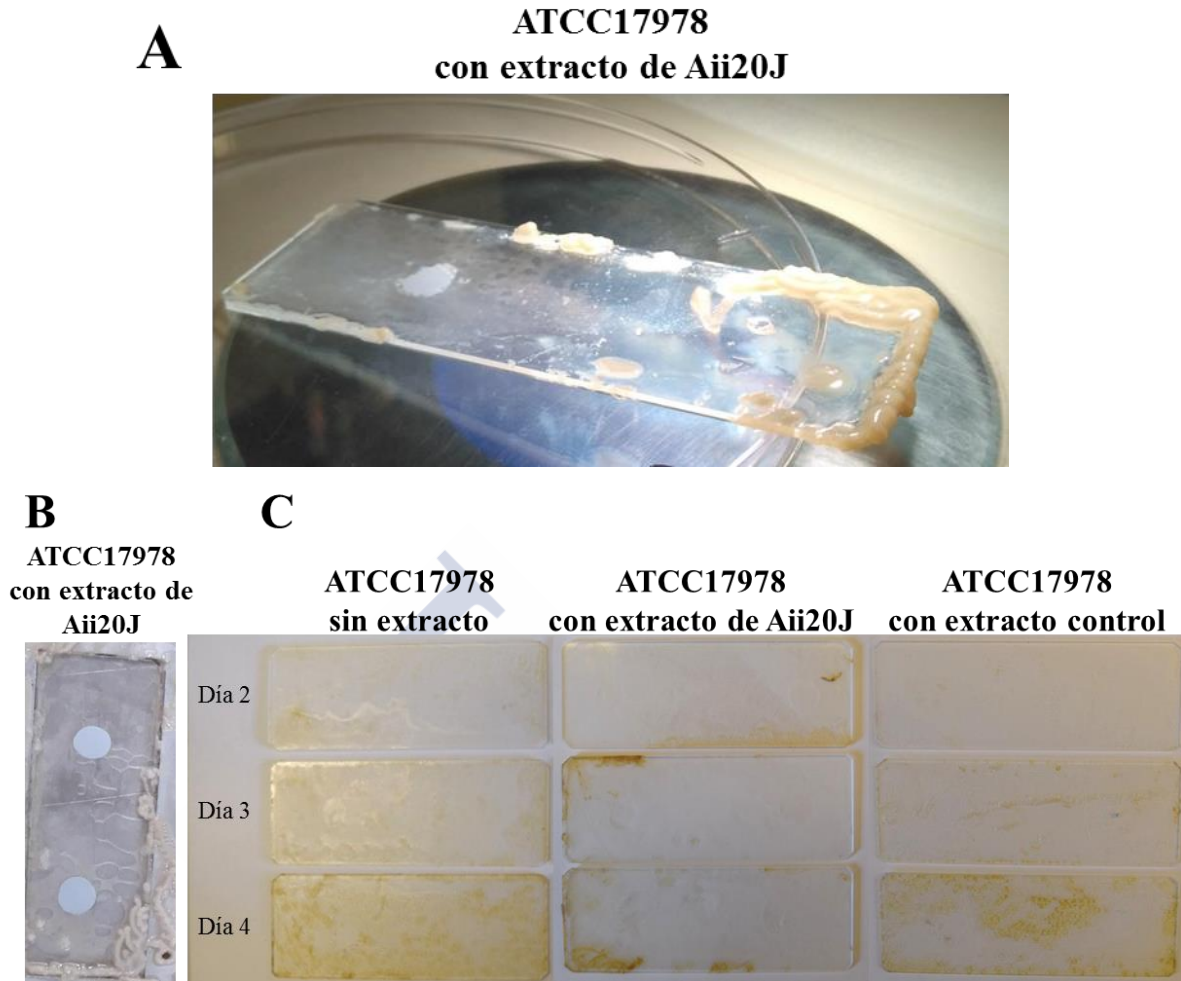


Figura 68. Efecto del extracto celular de *E. coli* BL21(DE3)plysS con Aii20J (20 µg/mL) sobre la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978. **A)** Fotografía de la biopelícula (día 4) de un portaobjetos. **B)** Biopelícula tras 4 días en el biorreactor de biopelícula. **C)** Portaobjetos secos correspondientes a los días 2, 3 y 4 con y sin extracto de *E. coli* transformado con Aii20J y con el extracto control de *E. coli* BL21(DE3)plysS transformado con pET28c(+) sin el inserto de *aai20J*.

Microscópicamente, en presencia del extracto con Aii20J se observa una biopelícula con gran número de células muertas, ampliamente teñida de rojo (Figura 69), a pesar de que las curvas de crecimiento de los mismos cultivos fueron similares con y sin extracto de Aii20J (datos no mostrados). En presencia del extracto, las células se agregan de igual manera formando una masa, sin embargo, no es tan compacta, ni definida, como sin la adición del extracto. La biopelícula presenta más huecos en el interior, está más deshecha, pudiendo explicar el incremento en grosor y no sobre la superficie. No se encontraron diferencias visuales en relación al ADN liberado al medio ni a la tinción lipófila, aunque esta última apareció concentrada en determinados puntos sin llegar a formar una capa continua como en la biopelícula sin extracto de Aii20J (Figura 69).

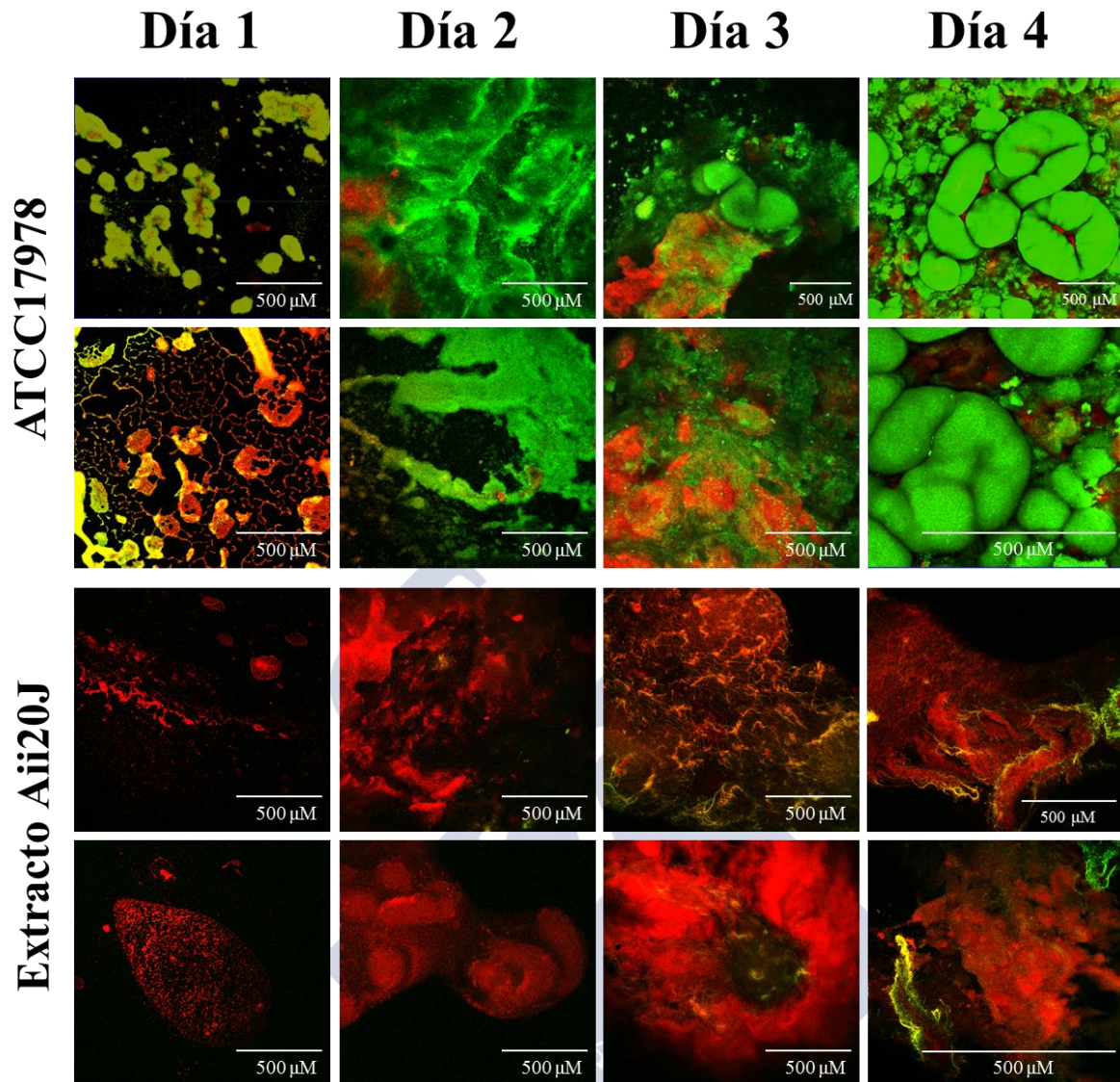


Figura 69. Imágenes de distintos días tomadas al microscopio confocal (10x) de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 con o sin extracto celular de *E. coli* BL21(DE3)plysS con Aii20J (20 μg/mL). La biopelícula se tiñó con SYTO9® (verde) e ioduro de propidio (rojo) para distinguir células vivas de células muertas. Las imágenes son representativas de 3 ensayos independientes y consecutivos.

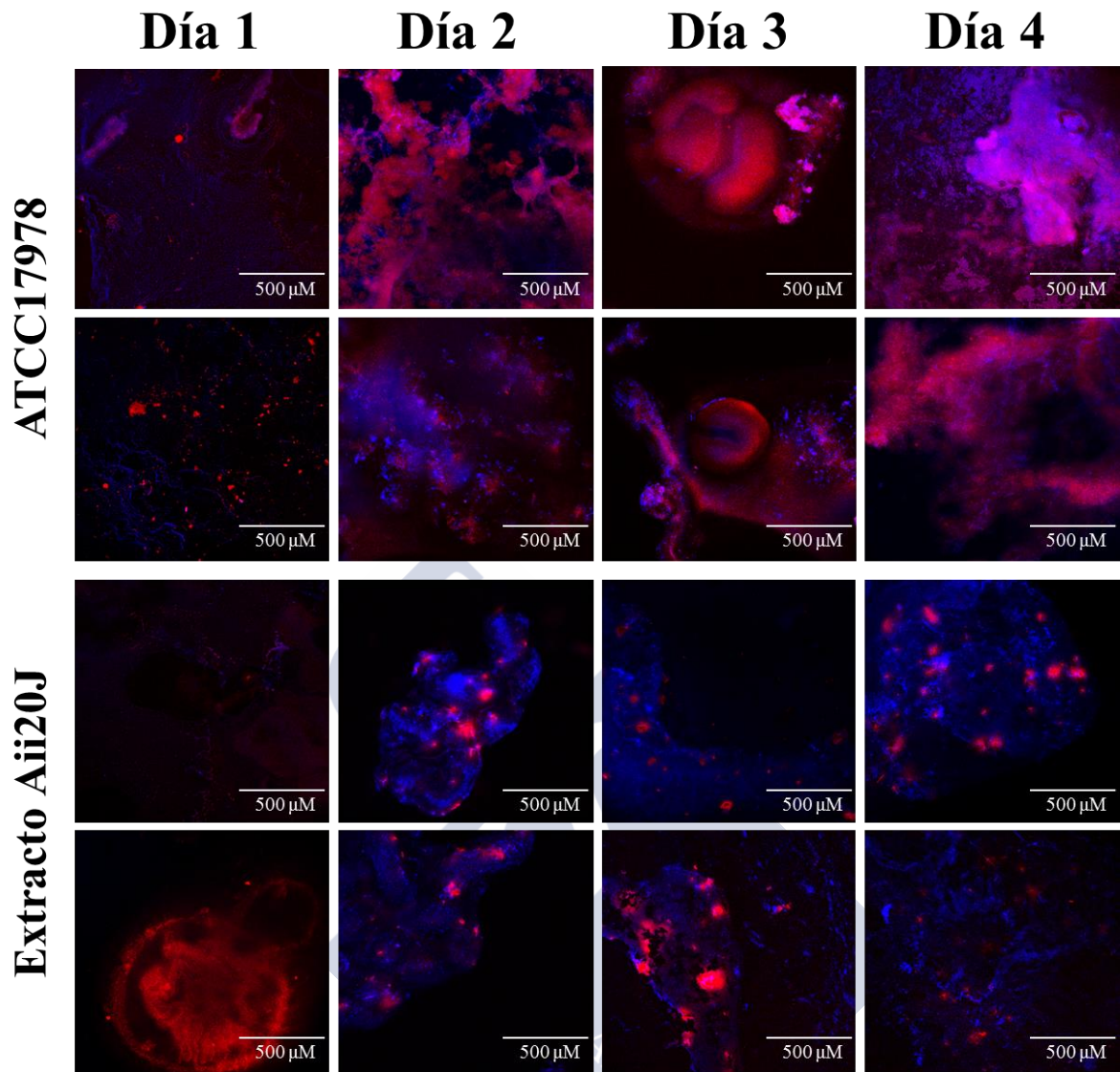


Figura 70. Biopelícula observada al microscopio confocal (10x) de *A. baumannii* ATCC17978 con o sin extracto celular de *E. coli* BL21(DE3)plysS con Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las fotografías se tomaron en distintos días tras teñir a biopelícula con YOYO (azul) y FM4-64 (rojo) y son representativas de 3 experimentos distintos e independientes.

En cuanto a la biomasa total de la biopelícula, con el extracto de Aii20J disminuyó hasta un 85% en peso en el día 4 (Figura 71) presentando una cantidad similar de biopelícula que el mutante de la sintasa de AHLs. Sin embargo, el control del extracto sin Aii20J también produjo una reducción inicial de la biomasa de la biopelícula, aunque no tan significativa como la del extracto con Aii20J, que no se mantuvo en el tiempo.

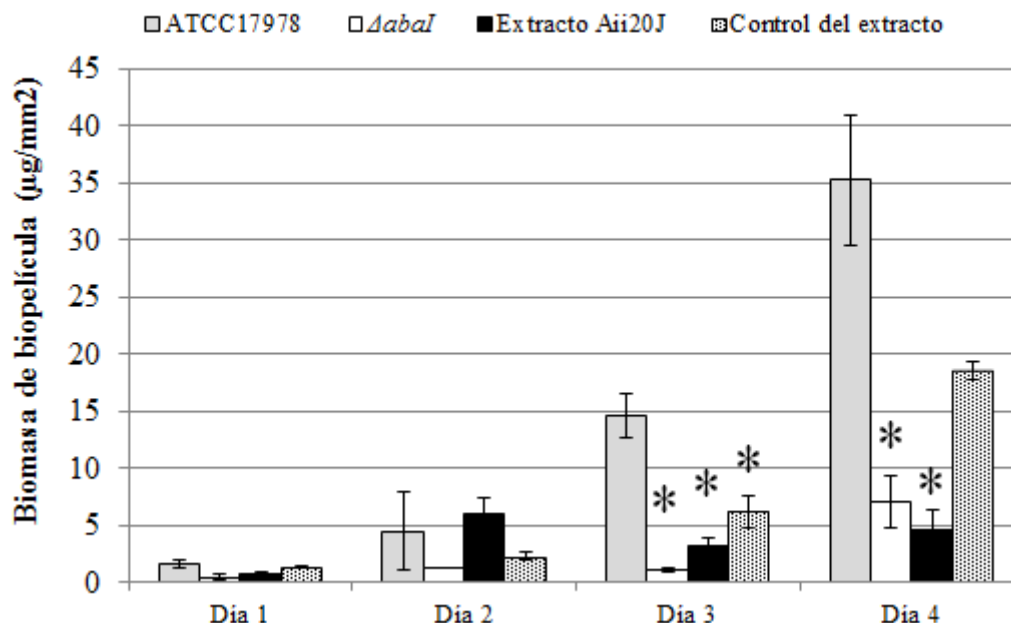
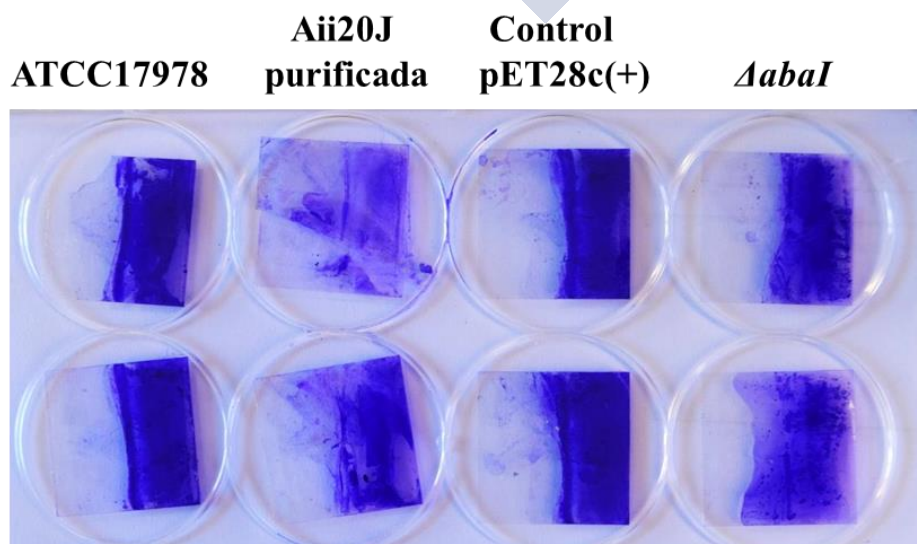


Figura 71. Biomasa de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, de $\Delta abaI$ y de *A. baumannii* ATCC17978 con el extracto de *E. coli* BL21(DE3)plysS con Aii20J (20 µg/mL) y con el extracto de *E. coli* sin el inserto de *aai20J*, en el nuevo biorreactor de biopelícula. Se muestran las medias de dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno y las desviaciones estándar. Los asteriscos indican la significación frente al control de ATCC17978 sin tratamiento (prueba *t* de Student, $P < 0,05$).

Para comprobar que la enzima Aii20J era la que presentaba actividad anti-biopelícula y no otra proteína presente en el extracto de *E. coli*, se realizó un último experimento cultivando la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 con y sin enzima purificadas en este caso en una modificación del modelo de adhesión activa de formación de biopelícula denominado *Amsterdam active attachment model* o *AAA-model* (Exterkate et al. 2010), sobre cubreobjetos de vidrio. Además, se añadió el control de la purificación sin la enzima, el mutante $\Delta abaI$, el extracto de *E. coli* transformado con Aii20J y el extracto control sin el inserto de *aai20J*. La formación de biopelícula se observó mediante microscopía confocal de fluorescencia y teñida y cuantificada con cristal violeta para observar posibles diferencias entre las distintas condiciones (Figuras 72 y 73).



3. Quorum sensing y formación de biopelícula

Figura 72. Biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, con Aii20J purificada (20 µg/mL) o con la purificación control de *E. coli* transformado con el plásmido sin el inserto (Control pET28c(+)) y del mutante $\Delta abal$, formada en los cubreobjetos del modelo en placa de 12 pocillos, recogidos el día 4 y teñidos con cristal violeta. En la fotografía se muestran dos réplicas de cada condición, el resto fueron utilizadas para microscopía confocal.

A pesar de que la cuantificación por cristal violeta no presentó diferencia alguna entre las distintas condiciones (datos no mostrados), la observación a simple vista permitió detectar diferencias entre el tratamiento con la enzima Aii20J y con el control de la purificación del plásmido sin el inserto de *aii20J*, al igual que el mutante $\Delta abal$, confirmando una vez más el requerimiento del QS para la producción y posterior desarrollo de la biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 73). La metodología tampoco permitió detectar diferencias entre ATCC17978 y $\Delta abal$. Debido a la inespecificidad de la tinción de cristal violeta no podemos por lo tanto evaluar si las diferencias observadas visualmente derivan de una mayor cantidad de matriz o de diferencias estructurales de la formación de biopelícula.



Día 4

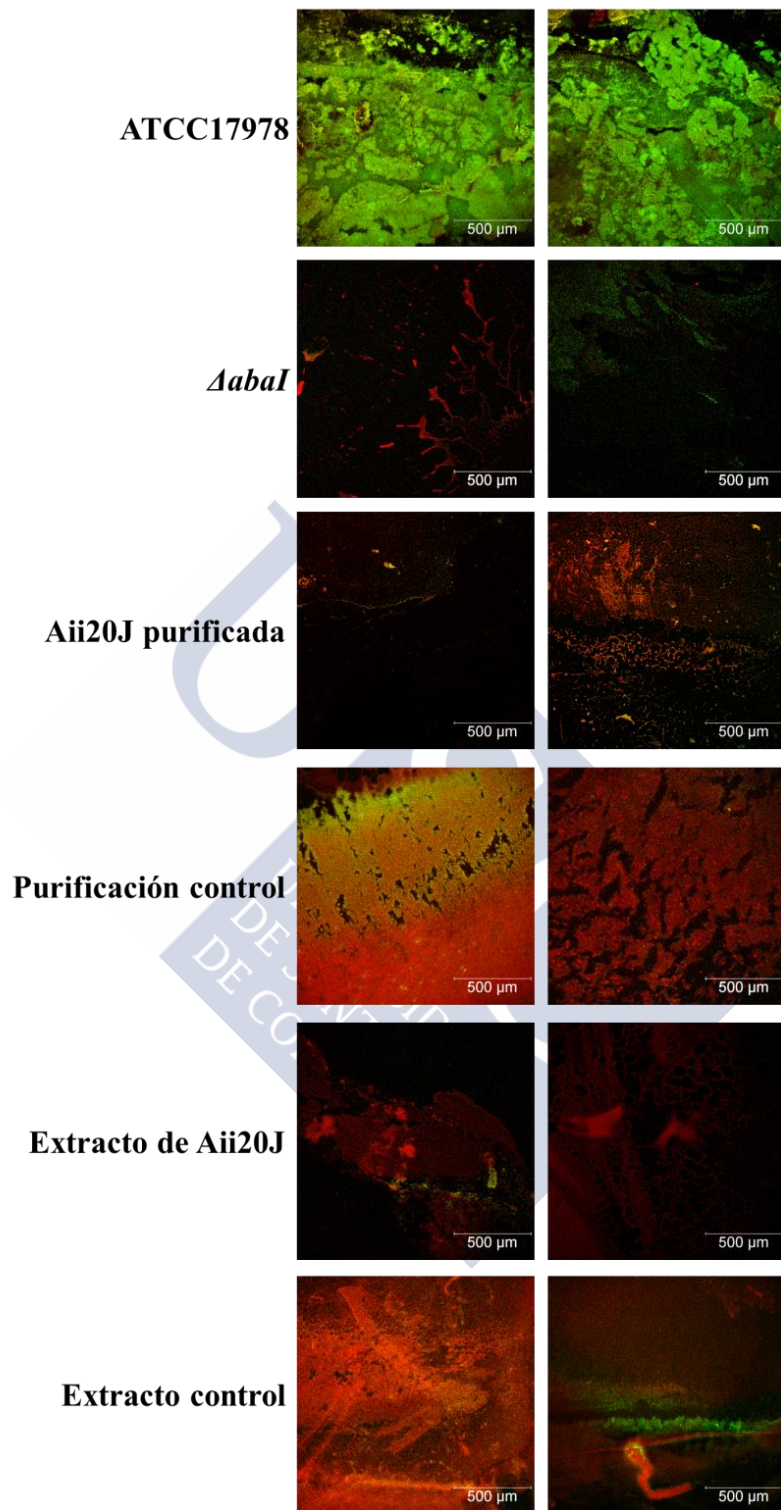


Figura 73. Imágenes tomadas al microscopio confocal (10x) de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, del mutante $\Delta abal$ y de *A. baumannii* ATCC17978 con Aii20J purificada (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Aii20J), o con el extracto celular de *E. coli* BL21(DE3)plysS con Aii20J (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Extracto de Aii20J). Como controles se añadió el extracto celular del plásmido sin el inserto de *aai20J* (Extracto control) y este extracto purificado mediante el mismo proceso que Aii20J (Purificación control). La biopelícula se cultivó en el modelo de placas microtiter de 12 pocillos sobre cubreobjetos. Tras 4 días se tiñó con SYTO9® (verde) y ioduro de propidio (rojo) para distinguir células vivas de células muertas. Las imágenes son representativas de 2 ensayos realizados de forma independiente y consecutiva.

3. Quorum sensing y formación de biopelícula

Dada la dificultad de obtener una biopelícula representativa en otro modelo que no sea el biorreactor de biopelícula que le aporta oxígeno de manera continua, en el modelo de adhesión activa no se consiguió obtener un control de la biopelícula tan consistente como la formada en el biorreactor resultando en una menor diferencia entre los distintos tratamientos (Figura 73). A pesar de ello, la adición de Aii20J purificada produjo una disminución considerable de la biopelícula en comparación con el control sin tratamiento y con el control de la purificación, incluso similar a la formada por el mutante $\Delta abal$ (Figura 73). De este modo, se demuestra la actividad anti-biopelícula de la enzima Aii20J. El control del extracto de *E. coli* con Aii20J sobre-expresada, también disminuyó la producción de biopelícula de *A. baumannii*, sin embargo, en menor medida que la enzima purificada y con menores diferencias en comparación con su control del extracto de *E. coli* con el plásmido sin el inserto de *aii20J* (Figura 73), posiblemente debido a la interacción con otros componentes presentes en el extracto. Aunque se necesitaría producir enzima a mayor escala para probar en el biorreactor de biopelícula utilizado a lo largo de este trabajo o usar un biorreactor con un volumen menor de medio de cultivo, podemos afirmar que Aii20J es una enzima capaz de disminuir la producción de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 mediante su actividad QQ dependiente de AHLs.



Discusión

En este capítulo, se trató de caracterizar el proceso de formación de la biopelícula de *A. baumannii* en diferentes métodos de cultivo y mediante técnicas clásicas como el cristal violeta o la resazurina como paso previo a la evaluación de la influencia de los procesos de QS sobre esta importante característica para la virulencia y dispersión de este patógeno. Los resultados obtenidos en placas microtiter y tubos eppendorf con diferentes volúmenes fueron inconsistentes y poco fiables en cuanto a la caracterización de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, de *A. nosocomialis* y de varios aislados del género. Sin embargo, podemos resaltar que *A. baumannii* ATCC17978 forma más cantidad de biopelícula total en un sistema estático en estos modelos de cultivo (Figura 51). Este resultado concuerda con los datos de formación de biopelícula en medio LB de *A. baumannii* ATCC19606^T que disminuyeron bajo agitación, en comparación en superficies de poliestireno, polipropileno y borosilicato (Tomaras et al. 2003). Nuestro resultado se correlaciona fuertemente con la observación de que solo se ha detectado producción de señales de QS en *A. baumannii* en las condiciones sin agitación, como demostramos en el primer capítulo, que intervendrían por lo tanto en el proceso de formación de biopelícula. Además, aunque la agitación aumente la aireación del sistema, las condiciones estáticas mejorarían la adherencia de las células a la superficie como discutimos en el capítulo 1.

En este trabajo no fue posible obtener resultados consistentes de cuantificación de producción de película (*pellicle*) en la interfase aire-líquido en *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 52), siendo en algunos casos evidente una falta de congruencia entre la cantidad de película observada inicialmente y la cuantificación final tras tinción con cristal violeta. Aunque ATCC17978 es una especie formadora de película (Mussi et al. 2010, Nait Chabane et al. 2014a), estudios previos ya revelaron las dificultades de cuantificar formación de película en *A. baumannii* principalmente debido a la pérdida de muestra al descartar el medio de cultivo y al posterior lavado previa tinción con cristal violeta (McQueary y Actis 2011). A pesar de ello, la observación de películas formadas en los diferentes modelos de cultivo utilizados en este trabajo, así como las dificultades de las células de ATCC17978 para fijarse a la superficie del fondo de pocillos de placas, como en el sistema X-CELLigence®, indicaron la necesidad de un incremento de la exposición al oxígeno de los cultivos para la obtención de biopelícula. A su vez, esto explicaría la falta de consistencia y gran variabilidad de los resultados obtenidos mediante cuantificación en modelos de formación de biopelícula clásicos utilizados (placas microtiter y tubos eppendorf), ya que, en estos sistemas de cultivo, la aireación es bastante limitada.

El sistema bajo flujo continuo BioFluxTM nos permitió establecer el medio de cultivo óptimo para posteriores experimentos de formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978. Mediante la fotografía secuencial, observamos que en el medio LB con baja concentración de sal las células de *A. baumannii* se apilaron en grumos formando pequeños agregados susceptibles de deshacerse a causa de las condiciones de la fuerza de flujo (Figura 53), lo que nos ayudó a pensar que otros nuevos modelos de formación de biopelícula con flujo menos intenso podrían mejorar la formación de biopelícula. De acuerdo con nuestros resultados, otro estudio reveló que el LB con menor concentración de sal es el medio más adecuado para que aislados de *A. baumannii* y *Acinetobacter lwoffii* produzcan mayor biopelícula (Pour et al. 2011). En este medio además, es donde se produce mayor concentración de AHLs, demostrada en el primer capítulo, apoyando la hipótesis del requerimiento del QS en la formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978. A pesar de probar distintos medios de

cultivo, nuestros resultados contrastan con la descripción de otros autores de la capacidad de *A. baumannii* ATCC17978 de formar biopelícula en las paredes del microcanal en el medio de cultivo M-H (Nait Chabane et al. 2014a). Por otra parte, otros autores lograron observar desarrollo de biopelícula de cepas de *Acinetobacter* resistentes a colistina en el sistema BioFlux™, sin embargo, las diferencias pueden deberse a diferencias en las condiciones utilizadas o a diferencias en la especie utilizada (Dafopoulou et al. 2016). Además, en el LB con baja sal en el sistema BioFlux™ observamos de nuevo la formación de la película en la fase aire-líquido y microscópicamente diferenciamos dos tipos distintos de agregación celular en el fondo del pocillo y en la película, formando en esta última largas hileras de células (Figura 54). Distintos tipos de agregados en el fondo del pocillo y en la interfase aire-líquido se observaron en *A. baumannii* ATCC19606^T, donde se describen conglomerados más densos y compactos en la zona del pocillo que se encuentra en contacto con el aire, con canales entre células que podrían proveer nutrientes a las células y eliminar residuos celulares (Tomaras et al. 2003). En el aislado clínico *A. baumannii* BM4421 también observaron agregados celulares flotando en la superficie del medio de cultivo, separados por espacios vacíos, en los que las células aparecen conectadas unas con otras mediante estructuras que recuerdan a pili (McQueary y Actis 2011). Sin embargo, estos autores no observan las estructuras filiformes que obtuvimos en el sistema BioFlux™, que tampoco fueron descritas en otros estudios de película producida por *A. baumannii* (Martí et al. 2011, Nait Chabane et al. 2014).

El nuevo biorreactor de interfase resultó ser el sistema óptimo para formación de biopelícula de este patógeno, ya que *A. baumannii* ATCC17978 produjo una biopelícula consistente que pudimos caracterizar para utilizarla como modelo de estudio de influencia del QS sobre la biopelícula de este patógeno. En este nuevo biorreactor de formación de biopelícula *A. baumannii* ATCC17978 desarrolló una biopelícula de hasta 0,5 mm de espesor durante 6 días en una superficie de vidrio. Tras la adhesión celular y fijación a la superficie, comienza la proliferación celular y la agrupación de las células constituyendo pequeños conglomerados. Está descrito que la formación de microcolonias ocurre tras la migración y fusión organizada de estos conglomerados celulares (Haagensen et al. 2015). Como observamos, las microcolonias se aglomeran entre ellas resultando en estructuras concéntricas con aspecto de melocotón, las cuales confluyen y se agrupan hasta recubrir toda la superficie (Figuras 58 y 59). Hasta lo que conocemos, es la primera vez que se consigue una biopelícula de *A. baumannii* de tales características y con estas estructuras organizadas. En otro estudio acerca de la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 sobre distintos sustratos solo consiguieron observar estructuras de tipo seta (*mushroom-like structures*), pero de menor tamaño que las que se observaron en nuestro sistema, tras 4 días en un reactor de biopelícula (CDC Biofilm Reactor®, Biosurface Technologies) con flujo continuo de medio de cultivo y exclusivamente en superficies de policarbonato y acero inoxidable (Greene et al. 2016). En ese sistema, sobre superficie de cristal, *A. baumannii* desarrolló una biopelícula delgada y frágil con pequeños agregados planos con el menor número de UFCs alcanzado en comparación con superficies de goma, porcelana, polipropileno, policarbonato y acero (Greene et al. 2016), contrastando con nuestros resultados de biopelícula formada en portaobjetos y cubreobjetos de cristal. Estas diferencias podrían explicarse por la mayor cantidad de oxígeno que aporta nuestro biorreactor ya que la superficie permanece en continua inmersión/emersión a lo largo del experimento, permitiendo una oxigenación mayor de la biopelícula. Del mismo modo, el patrón de formación de las microcolonias de la biopelícula de *Acinetobacter* también depende de la alta disponibilidad de oxígeno en el ambiente, ya que suplementando la biopelícula

de *Acinetobacter* sp. C6 con oxígeno las células de *Acinetobacter* rellenan y ocupan los espacios vacíos entre las microcolonias (Haagensen et al. 2015). Este hecho, también explicaría la formación inconsistente de biopelícula de *A. baumannii* en sistemas con bajo aporte de oxígeno como placas microtiter, eppendorf, sistema X-CELLigence® o BioFlux™.

La disponibilidad de nutrientes condiciona la distribución de microcolonias en la biopelícula de *Acinetobacter* como ya ha sido descrito con anterioridad en cultivos de la cepa C6 con distintas fuentes de carbono (citrato, glucosa, benzoato o alcohol de bencilo) en un sistema de flujo continuo con cubreobjetos de cristal como sustrato (Haagensen et al. 2015). Estos autores además, comparan la distribución espacial de la biopelícula de *Acinetobacter* sp. C6 con los arbustos de la creosota de los desiertos (*Larrea tridentata*) que en las primeras etapas muestran una distribución en aglomeraciones, creciendo de forma aleatoria hasta las últimas etapas donde los arbustos más grandes se ubican siguiendo un patrón regular con espacios individuales equidistantes en consecuencia del aumento de la competencia por los nutrientes (Phillips y MacMahon 1981, Haagensen et al. 2015). En contraste con esta hipótesis de límite de nutrientes, el alto nivel de oxígeno que aporta nuestro reactor, evita los espacios vacíos entre las estructuras tridimensionales de aspecto de melocotón que se forman que terminan por recubrir toda la superficie a lo largo de los seis días (Figuras 58 y 59). Este hecho junto con que *Acinetobacter* es un género aeróbico estricto (Bouvet y Grimont 1987), apoya la hipótesis del gran requerimiento de oxígeno de *Acinetobacter* para desarrollar biopelícula y pone de manifiesto el potencial de este nuevo reactor que actualmente se encuentra bajo proceso de patente, para el estudio de biopelículas de patógenos con estas características. Por otra parte, se ha descrito que la limitación de oxígeno produce la dispersión de la biopelícula en *Acinetobacter* (Hansen et al. 2007). En nuestros resultados, ATCC17978 comienza a dispersarse a partir del día 6 de cultivo en el biorreactor al desprenderse las estructuras tridimensionales de la superficie.

En relación a la composición de la biopelícula, nuestros resultados mostraron que la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 presenta una gran cantidad de componente lipídico recubriendo las células, que en parte se correspondería con las membranas celulares y se encuentra envuelto por una nebulosa de ADN (Figura 64). En varias cepas de *A. baumannii*, entre ellas ATCC17978, solo consiguieron visualizar una masa de exopolisacáridos teñidos con blanco de calcoflúor en la cepa multirresistente ACICU en biopelícula de 7 días de cultivo (Gentile et al. 2014). Nuestros resultados mostraron mucha mayor cantidad de matriz extracelular en la biopelícula de ATCC17978, posiblemente debido a diferencias en el método utilizado de producción de la misma (Gentile et al. 2014). La presencia de ácidos nucleicos como parte de la biopelícula ya está descrita en otros patógenos como *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Steinberger y Holden 2005, Sugimoto et al. 2018). En *P. aeruginosa* el ADN extracelular (ADNe) puede ser usado eficientemente para la construcción de la matriz y servir como un soporte de andamiaje durante la agregación bacteriana y la estabilización de biopelículas (Whitchurch et al. 2002, Yang et al. 2007). En un estudio acerca de *A. baumannii* AIIMS7, que no presenta procesos de transformación natural, demostraron que el ADNe, que es liberado en fases tempranas de crecimiento en vesículas de membrana de 20-200 nm diámetro y mediante lisis celular en las últimas etapas de crecimiento (Sahu et al. 2012), es crucial para la formación de biopelícula, independientemente de su origen (Sahu et al. 2012). *A. calcoaceticus* también libera pequeñas cantidades de ADN durante la fase exponencial en cultivos en *batch* mediante lisis celular para intercambio de ADN (Palmen y Hellingwerf 1995). Además,

biopelículas preformadas en *Acinetobacter* fueron disgregadas por DNasaI, al igual que ocurre en *P. aeruginosa*, apoyando su importancia (Whitchurch et al. 2002, Sahu et al. 2012). Coincidiendo con nuestra observación al microscopio, esta red de filamentos que forma una nebulosa ya fue observada en biopelículas de una Gammaproteobacteria acuática denominada cepa F8 en la que el ADNe forma estructuras del mismo aspecto de mallas con filamentos definidos que aportan estabilidad durante el desarrollo de la biopelícula y que dependen del medio de cultivo, de la bacteria y de la madurez de la biopelícula (Böckelmann et al. 2006). En *P. aeruginosa*, forma como una red como si fuera una cuadrícula o malla (Allesen-Holm et al. 2006) y se encuentra concentrado en la parte exterior de los pies de las microcolonias con forma de seta formando un borde entre células que forman el pie y células que forman la parte superior de la microcolonia (Allesen-Holm et al. 2006, Flemming y Wingender 2010). Estos autores han descrito la posibilidad de que el ADNe en los pies de las setas pueda causar la acumulación de bacterias migrantes resultando en la formación de la parte superior de las microcolonias en forma de seta (Flemming y Wingender 2010). Del mismo modo, *A. baumannii* podría estar usando el ADNe para formar las estructuras tridimensionales en forma de melocotón que observamos al microscopio confocal.

Si bien llegamos a la conclusión de que existe poca reproducibilidad de los datos y mucha variabilidad de los resultados en los primeros métodos de cultivo para formación de biopelícula, los ensayos realizados con cristal violeta en microtiter nos proporcionaron los primeros indicios de que el QS interviene en la formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, ya que el mutante de la sintasa de AHLs produjo, en general, menos biopelícula que la cepa parental (Figuras 50 y 51). Además, en este sistema, los resultados de la adición de los cultivos con la lactonasa de QQ Aii20J confirmaron la relación entre el QS y la biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978, afectando negativamente a la producción de biopelícula sin afectar a su crecimiento (datos no mostrados). Numerosos estudios respaldan el papel del QS en la formación de la biopelícula en *A. baumannii*. En concordancia con nuestros primeros resultados, la mutación de las sintasas y receptores de AHLs afectó a la formación de biopelícula medida con cristal violeta en distintas cepas de *Acinetobacter* (Anbazhagan et al. 2012, Chow et al. 2014, Oh y Choi 2015). Sin embargo, el mutante Δ abaI de *A. nosocomialis* M2 alcanzó una cantidad de biopelícula similar a la de la cepa parental y la formación de biopelícula no se vio afectada por la enzima Aii20J en tubos eppendorf (Figura 51). Este resultado, al igual que la motilidad evaluada en el primer capítulo, indica que el QS no es un requerimiento esencial en *A. nosocomialis* M2 para producir ambos fenotipos, al menos bajo las condiciones ensayadas. En contraste con nuestros resultados, otros autores describieron una disminución de biopelícula por parte del mutante Δ abaI en comparación con la cepa parental M2, a las 24 h en placa microtiter (Niu et al. 2008), y en tubos de microcentrífuga de poliestireno durante 5 días, a 37°C, en medio LB con glicerol al 1% (v/v) (Bhargava et al. 2012). Estas diferencias podrían explicarse por las distintas condiciones utilizadas, en el primer caso por la temperatura que utilizan en el ensayo (30°C) frente a la de este trabajo (37°C), que modifican el efecto del sistema de QS en la producción de biopelícula por parte de esta especie, como quedó demostrado en el primer capítulo con la motilidad (Figura 23). En el segundo caso, la suplementación del medio LB con glicerol, que mejora la producción de biopelícula, además de la duración del cultivo de la biopelícula explicaría las diferencias con nuestros ensayos (Bhargava et al. 2012, 2015).

Además, estos autores consideraron que el QS interviene en las últimas etapas de la maduración de la biopelícula, ya que no encontraron diferencias de formación de la misma en el mutante de la sintasa de AHLs en un corto periodo de tiempo en *A.*

nosocomialis M2 (Niu et al. 2008). Sin embargo, el QS mediado por AHLs también se ha asociado con la mejora de la adherencia a superficies abióticas para formar biopelícula en las primeras etapas en *A. baumannii* ATCC19606^T, además de acelerar la maduración de las biopelículas (Luo et al. 2015). A pesar de que no pudimos obtener conclusiones del ensayo de adherencia bacteriana con el mutante de la sintasa de AHLs o la lactonasa de QQ Aii20J frente a *A. baumannii* ATCC17978, sería interesante analizar la producción de AHLs en cada etapa de la formación y desarrollo de la biopelícula de ATCC17978 para determinar exactamente en qué momento/s del proceso es esencial el QS. Los pequeños agregados observados en el ensayo de adherencia (Figura 55), que no se descarta que puedan ser agregados de sales, tal vez no se fijaron a la superficie por el agotamiento de oxígeno en los pocillos, coincidiendo con la descripción de Haagensen et al. (2015), donde la formación de microcolonias tras la proliferación celular y posterior formación de conglomerados celulares de *Acinetobacter* sp. C6 se ve afectada negativamente por la falta de disponibilidad de oxígeno.

El mutante $\Delta adeB$ de la bomba AdeABC mostró una disminución de biopelícula, aunque con cierta variabilidad entre experimentos (Figuras 49 y 50). La lactonasa Aii20J también redujo la formación de biopelícula, cuantificada mediante cristal violeta (Figura 50), al igual que su motilidad asociada a superficie estudiada en el primer capítulo. La producción de menores concentraciones de AHLs que la cepa parental (Tabla 3) podría explicar la disminución de la formación de la biopelícula observada. De acuerdo con estos resultados, un mutante $\Delta adeB$ produjo una inhibición de la producción de biopelícula en placa microtiter en la cepa multirresistente a drogas AYE y en *A. baumannii* BM4587 pero no en el aislado *A. baumannii* S1, indicando que la contribución de la bomba AdeABC podría ser dependiente de la cepa pudiendo presentar distintas funciones en cada una (Yoon et al. 2015, Richmond et al. 2016). En otro estudio observaron una correlación positiva entre los genes *adeB* y *adeG* de la bomba AdeFGH y la formación de biopelícula en aislados clínicos de *A. baumannii* (He et al. 2015). Se observó además una correlación entre la sobre-expresión del gen *adeG* y la sobre-expresión de la sintasa *abaI*, sugiriendo un efecto potencial de la bomba AdeFGH con la sintasa de AHLs en el desarrollo de biopelículas en *A. baumannii* (He et al. 2015). De este modo, hipotetizaron que la sobre-expresión de estas bombas de expulsión aceleraría la síntesis y el transporte de las AHLs durante la formación de biopelícula en *A. baumannii* (He et al. 2015). Aunque está claro que existe una correlación entre el QS y esta bomba, debido a la baja reproducibilidad de nuestros resultados en los sistemas de placa microtiter, sería necesario determinar la formación de biopelícula del mutante $\Delta adeB$ en el nuevo modelo del biorreactor, para poder confirmar o descartar la relación de la bomba AdeABC con la formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978.

Los resultados del biorreactor de biopelícula corroboran los obtenidos con cristal violeta ya que $\Delta abaI$ produjo mucha menor biomasa en la biopelícula que su cepa parental, especialmente en los días 3 y 4 (Figuras 58 y 59), confirmando el papel esencial del QS en la formación de biopelícula de *A. baumannii*. En comparación con la cepa parental, la biopelícula de $\Delta abaI$ también mostró diferencias estructurales, sin conseguir colonizar por completo la superficie de los portaobjetos y cubreobjetos utilizados como superficie para el desarrollo de biopelícula y con las microcolonias con forma de melocotón, más simétricas y en menor número, aparecieron diseminadas por la superficie (Figuras 60, 61 y 62). Además, se observó un mayor número de células muertas en la matriz de $\Delta abaI$, aunque las curvas de crecimiento de los cultivos fueron similares que las de la cepa parental (datos no mostrados). La observación de estructuras

tridimensionales aisladas y en menor número del mutante *ΔabaI*, podría deberse a que el QS sea necesario para la expresión coordinada de genes importantes para que las células no migren sobre la superficie y no formen todas las estructuras esféricas descritas en concordancia con la ausencia de motilidad de *ΔabaI* de ATCC17978 demostrada en el primer capítulo (Figura 17) y que apoyarían el papel del QS en las etapas maduras de la formación de biopelícula (Niu et al. 2008, Luo et al. 2015). Recientemente, se ha publicado que un homólogo de la proteína A1S_1510, perteneciente al clúster involucrado en producción de pili de tipo I (A1S_1507-A1S_1510) que participa en la adhesión a células epiteliales y a superficies plásticas, se sobre-expresa en la biopelícula de *A. baumannii* MAR002, una cepa clínica hiper-productora de biopelícula (Álvarez-Fraga et al. 2016), pudiendo intervenir en la producción de las estructuras tridimensionales bajo el control o no del QS.

En cuanto al efecto de la mutación de *abaI* sobre la estructura molecular de la biopelícula, no observamos ninguna diferencia significativa en relación con la tinción lipófila entre el mutante *ΔabaI* y la cepa parental (Figura 64). Simplemente, al formar menos biomasa no encontramos tanto material teñido. En *P. aeruginosa* se ha descrito recientemente que la síntesis del surfactante ramnolípido, que ayuda a mantener la biopelícula, es un proceso regulado por QS que ocurre principalmente en las microcolonias con forma de seta (Davey et al. 2003, Lequette y Greenberg 2005). A pesar de que varios aislados clínicos y no clínicos de *Acinetobacter* también producen este surfactante (Prakasam et al. 2013), nuestros resultados parecen indicar que la producción de lípidos no está controlada por QS en *A. baumannii* ATCC17978. El mutante *ΔabaI* tampoco mostró diferencias en cuanto a la liberación del ADN de la biopelícula frente a la cepa parental ATCC17978 (Figura 64), aunque el último día del ensayo (día 4) se observó menos intensidad de la red o nebulosa del ADN en *ΔabaI*. Estas pequeñas diferencias en la malla de ADN formado, halladas en el último día del ensayo entre *ΔabaI* y el control, podrían deberse a que la menor biopelícula formada por el mutante no presente tanta carga de células capaz de liberar o producir la misma cantidad de ADN que en la cepa parental. Otra posibilidad podría ser que pueda estar controlado por el QS y que al dejarse de producir se disminuya el efecto de malla o soporte que produce, favoreciendo una biopelícula menos consistente o más dispersa. En otros patógenos como *P. aeruginosa*, se ha descrito que el ADN se genera al menos por dos vías distintas, una de ellas dependiente de QS (De Kievit et al. 2001, Allesen-Holm et al. 2006). Aunque parece que el QS no controla la producción de ADN en ATCC17978, se necesitaría realizar más ensayos para confirmar o descartar esta hipótesis.

Mediante análisis con microscopía electrónica de barrido se ha demostrado que las células deficientes en la proteína de superficie Bap permanecen predominantemente en una capa simple, como si fuera una alfombra con escasas áreas de agregados celulares y sin formar las estructuras tridimensionales, que consisten en torres multidimensionales separadas por canales de agua (Brossard y Campagnari 2012). En nuestros resultados con el mutante *ΔabaI*, observamos la ausencia de estructuras tridimensionales. Aunque no hay estudios que relacionen el QS con Bap y que las estructuras tridimensionales de *A. baumannii* ATCC17978 podrían formarse por migración de las células dentro de la biopelícula, al igual que ocurre en *P. aeruginosa* para formar las setas (Flemming y Wingender 2010), la proteína Bap podría estar conectada con el QS en el desarrollo de las últimas etapas de la biopelícula o podría actuar independientemente del QS pero ser igual de necesaria en este proceso multifactorial. Otros autores ya dejaron abierta esta posibilidad, indicando que es posible que el QS influya en la expresión de genes como el que codifica para esta proteína o el operón *csu* (Niu et al. 2008), o el cluster de pili

tipo I antes citado (Álvarez-Fraga et al. 2016), aunque está sin determinar. Sería interesante comprobar si Bap se encuentra bajo el control del QS mediado por AHLs en *A. baumannii* para permitir la colonización de una superficie y el posterior desarrollo de la biopelícula y si la expresión de esos pili también cambia en el mutante.

La adición de OHC12-HSL, la AHL mayoritaria producida por *A. baumannii* ATCC17978 (Figura 8), consiguió restaurar la biopelícula en el mutante Δ *abaI*, incrementando la cantidad de biomasa producida hasta un 50% del peso de la biopelícula (Figuras 59 y 65), confirmando una vez más la influencia del sistema de QS en la formación de biopelícula por ATCC17978 en las condiciones utilizadas en este trabajo. Este resultado coincide con la restauración de la biopelícula en el mutante Δ *abaI* de *A. baumannii* ATCC19606^T tras la adición de 100 μ M de C6-HSL (Luo et al. 2015), además del aumento de la producción de pili, derivado del aumento de la expresión de los genes del operón *csu* al añadirle la AHL, a pesar de no tratarse de la AHL específica del receptor AbaR (Luo et al. 2015). De hecho, estos autores afirman que la expresión de pili junto con este tipo de motilidad permiten a *A. baumannii* adherirse fácilmente a superficies abióticas para formar biopelícula (Luo et al. 2015). De acuerdo con las observaciones de que el QS interviene en las últimas etapas de la maduración de la biopelícula, interviniendo en su arquitectura y mantenimiento (Niu et al. 2008, Bhargava et al. 2012), la restauración de la biopelícula con la OHC12-HSL comenzó a dar sus frutos en el tercer y cuarto día del experimento en el biorreactor, mientras que los dos primeros días no se observaron diferencias en peso en comparación con el mutante y la cepa parental (Figura 59), aunque sí mostró un incremento considerable de células vivas en comparación con el mutante sin la AHL (Figuras 60, 61 y 65). En *A. baumannii* M2 y un aislado de *Acinetobacter* spp. también se describió el restablecimiento de la formación de biopelícula del mutante de la sintasa de AHLs con extractos celulares de la cepa salvaje o con AHLs añadidos de manera exógena (Niu et al. 2008, Anbazhagan et al. 2012, Bhargava et al. 2012). En contraste y a pesar de que el mutante Δ *abaI* de ATCC17978 ocasiona una biopelícula en láminas desgajadas y rotas, sin demasiadas células apiladas y con esferas tridimensionales mucho más perfectas que las de la cepa parental, la complementación con la OHC12-HSL no consiguió reconstruir estas estructuras tridimensionales aunque alcanzó casi el mismo grosor que la cepa parental (Figura 65), quizás por la baja concentración utilizada de AHL (10 μ M) en comparación con el resto de autores o porque sea necesario añadirla en el momento apropiado y no de forma continuada. Hay que añadir, que puede que la AHL no penetrase en la membrana para permitir la recuperación total de la biopelícula o que las AHLs adicionales que presenta *A. baumannii*, observada en el primer capítulo, sean necesarias para la formación completa de la biopelícula. De hecho, la mejor complementación de la biopelícula del mutante Δ *abaI* de *A. nosocomialis* M2, se ha observado al añadir AHLs heterólogas procedentes de *P. aeruginosa* PAO1, incrementándose el área de cobertura de la superficie con células apiladas tridimensionalmente y parcheando las zonas con escasos agregados celulares del mutante (Bhargava et al. 2012).

Al igual que se observó en el mutante Δ *abaI*, la adición del extracto purificado de la enzima Aii20J provocó una inhibición significativa de la cobertura de la superficie de la biopelícula demostrada visualmente y especialmente en los últimos dos días del ensayo, en comparación con el control del extracto y con ATCC17978 sin tratamiento (Figuras 69, 70 y 71). El extracto de Aii20J produjo una biopelícula más esponjosa y no tan consistente, con microcolonias más aisladas, lo que podría explicar el aumento en grosor de la misma y no sobre la superficie. Hay que añadir que con el extracto de Aii20J se observó un aumento de las células muertas de la biopelícula (Figura 70), sin

que hubiera diferencias entre las curvas de crecimiento celular con y sin el extracto de QQ. Si bien visualmente, no encontramos diferencias relativas al ADN liberado, la tinción lipófila se depositó en determinados puntos concentrados sin llegar a formar una lámina por la superficie (Figura 71), posiblemente debido al aumento en grosor y no a lo largo del sustrato. A pesar de que se alcanzó el mismo espesor de la biopelícula que en la cepa parental, el no recuperar por completo la formación de las estructuras tridimensionales, corrobora la hipótesis de que el QS interviene en el desarrollo de la arquitectura de la biopelícula y en las etapas tardías del desarrollo de la misma descrita por varios autores (Niu et al. 2008, Bhargava et al. 2012). Además, una hipótesis que explicaría el incremento del grosor de la biopelícula pero no de la cobertura de la superficie, podría ser que el patógeno busque lugares para dispersarse expandiéndose hacia otra superficie más adecuada, explicando la mayor acumulación de las microcolonias y agregados en zonas con mayor aporte de oxígeno (bordes donde es posible que queden burbujas de aire, etc...) en respuesta al extracto de Aii20J (Figura 68). Otra posibilidad es que los bordes permitan una mejor adherencia, ya que las propiedades físico-químicas de cada superficie juegan un papel clave en la adhesión celular y el posterior desarrollo de la biopelícula tanto en *Acinetobacter* como en otros patógenos como *P. aeruginosa*, *S. aureus* o *E. coli* (Hook et al. 2012, Greene et al. 2016). Varios autores describieron diferencias de formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC19606^T, en *A. baumannii* ATCC17978 y en varios aislados de *A. baumannii* y *A. lwoffii* según el material del sustrato, observando mayor producción de biopelícula sobre plásticos como poliestireno, policarbonato, polipropileno y Teflon que sobre cristales como borosilicato (Tomaras et al. 2003, Pour et al. 2011, Greene et al. 2016). Aunque parece ser que *A. baumannii* presenta distintos mecanismos de adherencia según la superficie a la que se adhiera para colonizarla y formar biopelícula sobre ella (de Breij et al. 2009), sería interesante probar diferentes sustratos en el nuevo biorreactor de interfase para evaluar en qué superficie *A. baumannii* ATCC17978 produce mayor formación de biopelícula.

A pesar de que el extracto de Aii20J redujo hasta en un 85% en peso la formación de biopelícula llegando a alcanzar valores similares que el mutante de la sintasa de AHLs (Figura 71), el control del extracto sin actividad QQ, también redujo la producción de biopelícula de *A. baumannii*. Sin embargo, en el sistema clásico de cubreobjetos sumergidos, la adición de la enzima purificada Aii20J inhibió casi por completo la formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978, llegando a alcanzar valores similares que el mutante de la sintasa de AHLs, confirmando el gran potencial de la enzima de QQ Aii20J contra el desarrollo de la formación de biopelícula en *A. baumannii* (Figura 73). De acuerdo con nuestros resultados, la enzima de QQ catalíticamente mejorada GKL de *Geobacillus kaustophilus* con actividad contra AHLs de cadena de entre 6 y 12 carbonos, también inhibe la cantidad de biopelícula en los aislados clínicos *A. baumannii* S1, S2 y R2, medida con cristal violeta en placa microtiter de 96 pocillos (Chow et al. 2010, 2014). Sin embargo, las grandes diferencias demostradas con microscopía confocal en este trabajo con 20 µg/mL de Aii20J, no concuerdan con lo que reportan en ese estudio en placas Petri de cristal de 35 mm, aun añadiendo su enzima a una concentración final de 1,2 mg/mL (Chow et al. 2014). Otra enzima con actividad QQ, MomL, fue capaz de reducir la biopelícula de *A. baumannii* LMG1031 en placas microtiter, cuantificada mediante cristal violeta a las 24 h y visualizada al microscopio confocal (Zhang et al. 2017). En otras cepas sin embargo, MomL solo redujo la biopelícula de *A. baumannii* LMG10520 cuando se añadió a una concentración de 50 µg/mL y en *A. calcoaceticus* LMG10517, *A. nosocomialis* M2 y *A. baumannii* AB5075 no encontraron diferencias ni siquiera a 200 µg/mL (Zhang et al.

2017). Además, MomL solo tuvo efecto sobre la susceptibilidad a los antibióticos de la biopelícula en *A. baumannii* LMG10520 (Zhang et al. 2017). Por eso, la gran variabilidad intra e interespecífica de formar biopelícula en el género *Acinetobacter* (Eijkelkamp et al. 2011b), es un detalle a tener en cuenta para poder extrapolar la capacidad de inhibición de biopelícula en otras especies del género, haciendo necesario ampliar los estudios en este campo y poder generalizar nuestros resultados a otras especies del género.

Aunque los resultados de este trabajo parecen indicar que el sistema de QS podría ser clave para evitar la formación de biopelículas por *A. baumannii*, es importante señalar que de acuerdo con un estudio realizado por de Breij et al. (2010), no parece haber una relación entre la capacidad de formar biopelícula en cepas de *A. baumannii* y el impacto clínico de las mismas. Curiosamente, el genoma de *A. baumannii* SDF, una cepa sensible a antibióticos aislada de piojos de humanos, no presenta en su genoma numerosos factores implicados en la formación de biopelícula, como el pili sintetizado por el operón *csu*, la sintasa de QS *abaI* y el enzima que produce el exopolisacárido PNAG, y sin embargo, forma en placa microtiter de poliestireno mayor cantidad de biopelícula que otras cepas como ATCC17978, el aislado clínico multirresistente a antibióticos AYE, o el aislado clínico multirresistente a antibióticos ACICU (Vallenet et al. 2008, Antunes et al. 2011). Este hecho sugiere que estos sistemas podrían no ser esenciales en todas las cepas o especies de *Acinetobacter* para formar biopelícula al menos *in vitro* y existan otros factores que permitan a la cepa SDF persistir sobre superficies mediante este fenotipo (Antunes et al. 2011), siendo clave también el estilo de vida de cada microorganismo para entender la adaptabilidad de *Acinetobacter* a distintos nichos ecológicos (Vallenet et al. 2008). En cualquier caso, este trabajo demuestra una vez más que el sistema de QS mediado por AHLs es esencial para la formación de biopelícula en *A. baumannii* ATCC17978. Además, debido a la importancia del QS en la patogénesis de *Acinetobacter*, la interferencia con estos mecanismos de señalización o inhibidores de QS representan una posible estrategia para el tratamiento de patógenos, controlando sus factores de virulencia o la producción de sus biopelículas (Dong y Zhang 2005, Dong et al. 2007, Williams et al. 2007). Finalmente, los resultados de la enzima de QQ Aii20J la convierten en un candidato con gran potencial para el control de la virulencia de este patógeno.



CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



1. Solamente las condiciones estáticas permiten detectar señales de QS en *A. baumannii* ATCC17978 y en el resto de cepas y aislados estudiados del género *Acinetobacter*. En estas condiciones y en especial con limitación de sal, se produce un incremento de los niveles de expresión de la sintasa *abaI* junto con el gen *csuD*, involucrados en la síntesis de AHLs y pili de tipo I, respectivamente, indicando una posible asociación entre el QS y las condiciones que promueven la adherencia celular en esta especie. OHC12-HSL es la señal mayoritaria en todos los aislados y especies estudiadas, produciendo también varias señales adicionales en menor proporción con variación intra e interespecífica. *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 presentaron un pico de producción de señales a las 17-24 horas de cultivo, coincidiendo con el final de la fase logarítmica, tras el cual la concentración de todas las señales de QS disminuye drásticamente, incluso en condiciones de pH controlado. Los mutantes de las sintasas de AHLs no produjeron ninguna señal de QS, confirmando que *AbaI* es la principal y probablemente la única responsable de la síntesis de AHLs en estas especies.

2. *A. baumannii* ATCC17978 presentó actividad QQ tanto en célula viva como en extractos celulares y medio de cultivo con preferencia por AHLs de cadena larga y esta actividad depende de las condiciones y del tiempo de cultivo. El resto de cepas y aislados estudiados presentaron también actividad QQ. Las condiciones que aumentan la producción de AHLs retardaron la aparición de la actividad QQ en *A. baumannii* ATCC17978 hasta las 17 horas de cultivo, explicando el pico de concentración de OHC12-HSL, además de estar correlacionadas con la sobre-producción de motilidad asociada a superficie en estas condiciones.

3. Además de *AidA*, se han identificado y purificado otras tres lactonasas de QQ en *A. baumannii* ATCC17978 pertenecientes a la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, en las que se ha comprobado la actividad QQ. Dos de ellas, la A1S_0383 y la A1S_2662, presentaron actividad QQ de amplio espectro, sin embargo, la A1S_1876 no fue capaz de degradar todo el rango de AHLs probado, al igual que *AidA*. La transcripción de estas tres lactonasas no sufrió grandes cambios bajo las condiciones que permiten la mayor producción de señales de QS, salvo la A1S_1876 que incrementó su expresión de forma considerable tras la adición de la AHL mayoritaria, indicando un posible papel importante de la misma en la autorregulación del QS en esta especie. Además, la α/β hidrolasa *AidA* está sujeta a mayor regulación por el sistema de QS. Aunque no se encontraron secuencias de acilasas en el genoma de *A. baumannii* ATCC17978, los resultados indican la existencia de más enzimas de QQ en la misma bacteria con distinto tipo de actividad, probablemente extracelulares.

4. *A. baumannii* ATCC17978 presentó motilidad asociada a superficie, al igual que M2 y la mayoría de los aislados probados. Tanto en *A. baumannii* como en *A. nosocomialis*, el patrón de motilidad varía según la disponibilidad de nutrientes y la salinidad del medio de cultivo. La alta osmolaridad del medio bloquea la motilidad en ambas especies y la disminución de la concentración de sal promueve la sobre-producción de este fenotipo en ATCC17978.

5. Los resultados corroboran que el QS mediado por AHLs está directamente involucrado en la motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978 ya que la mutación de la sintasa *AbaI* resultó en una inhibición completa de la motilidad. La enzima de QQ *Aii20J* inhibió la motilidad de *A. baumannii* así como la de todos los aislados motiles, indicando su posible utilización para el control de este fenotipo. No

obstante, tanto la mutación de la sintasa como la adición de la lactonasa Aii20J no mostraron ningún efecto sobre la motilidad de *A. nosocomialis* M2, indicando que al menos en las condiciones, la motilidad de *A. nosocomialis* M2 debe estar regulada por otros factores.

6. Entre los modelos de formación de biopelícula, el nuevo biorreactor de interfase resultó ser el mejor sistema para la caracterización de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, mejorando considerablemente la producción de biopelícula posiblemente debido al gran requerimiento de oxígeno de este patógeno para desarrollar una biopelícula consistente. En este biorreactor, *A. baumannii* produce una biopelícula de hasta 0,5 mm de espesor durante 6 días, con estructuras tridimensionales características que confluyen y recubren toda la superficie. Además, la biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978 presenta una gran cantidad de ADN extracelular que podría tener funciones de andamiaje o soporte.

7. La mutación de la sintasa de AHLs de *A. baumannii* ATCC17978 resulta en una biopelícula con mucha menor biomasa y con diferencias estructurales considerables con respecto a la cepa salvaje, que es restaurada en gran parte mediante la suplementación con la AHL mayoritaria, confirmando el papel crucial del QS en la formación de biopelícula de *A. baumannii*. La lactonasa Aii20J también afectó negativamente y de manera significativa a la producción de biopelícula, apoyando la utilización de esta enzima de QQ como una estrategia de control de la virulencia en este patógeno.



1. Only growth under static conditions allowed detection of AHL QS signals in *A. baumannii* ATCC17978 and all *Acinetobacter* strains and isolates tested. An increase in *abaI* and *csuD* genes expression, involved in AHL and type I pili synthesis respectively, was observed in static conditions, particularly in low salt media. These results suggest a link between QS and cell adherence in this species. OHC12-HSL is the main QS signal in all isolates and strains studied, with minor amounts of additional signals showing intra- and interspecies variation. *A. baumannii* ATCC17978 and *A. nosocomialis* M2 showed a peak of AHLs production between 17 and 24 hours corresponding to the late exponential growth phase. Afterwards, QS signals concentrations were sharply reduced, even in controlled pH culture conditions. Mutants of AHL synthases did not produce any QS signal, confirming that *AbaI* is the main synthase and probably the only one responsible for the AHLs synthesis in these species.

2. Wide spectrum AHL-QQ activity was detected in *A. baumannii* ATCC17978 biomass as well as cell free extracts and culture supernatants, although displaying preference for degradation of long-chain AHLs and was dependent on growth conditions and culture phase. All *Acinetobacter* strains and isolates tested also showed QQ activity. The culture conditions that increased AHLs production also delayed the QQ activity in *A. baumannii* ATCC17978 up to 17 hours of culture growth, a result consistent with the peak of OHC12-HSL concentration and with the surface-associated hyper-motile phenotype observed in these conditions.

3. Besides *AidA*, three new QQ lactonases, belonging to the metallo- β -lactamase superfamily, were identified, purified and their QQ activity verified in *A. baumannii* ATCC17978. Two of them, A1S_0383 and A1S_2662, showed wide-spectrum QQ activity. In contrast, and in common with *AidA*, A1S_1876 was not able to degrade all the AHL range tested. Under culture conditions that allow QS signals production and when OHC12-HSL was added to cultures, no significant change in the expression of genes coding for the lactonases A1S_0383 and A1S_2662 was observed, on the contrary A1S_1876 expression increased in cultures supplemented with the main AHL, suggesting a role in self-regulation of QS signals in this species. Moreover, the *AidA* α/β hydrolase is tightly regulated by the QS system. Although no acylases sequences were found in *A. baumannii* ATCC17978 genome, results indicate the existence of AHL-acylase activity in cell free supernatants.

4. *A. baumannii* ATCC17978 displayed surface-associated motility, as well as *A. nosocomialis* and the majority of clinical isolates tested. *A. baumannii* and *A. nosocomialis* produced different motility patterns depending on nutrient availability and culture medium salinity. High osmolality of culture media inhibits surface motility of both species, and low salt concentrations promote a hyper-motility phenotype in ATCC17978.

5. Results confirm that AHL-mediated QS is directly involved in surface motility of *A. baumannii* ATCC17978. The QQ enzyme *Aii20J* inhibited surface motility in *A. baumannii* and in all motile clinical isolates, revealing a potential use of this lactonase in the control of this phenotype. Nevertheless, AHL synthase mutation or *Aii20J* lactonase addition did not produce any change in *A. nosocomialis* M2 motility, suggesting that, at least in the conditions tested in this study, QS is not required for this trait in M2.

6. Among the different models of biofilm formation tested, the interface biorreactor was selected as optimal for biofilm development studies in *A. baumannii* ATCC17978, probably due to the high aeration required by biofilms of this species. In this new bioreactor *A. baumannii* formed a 0.5 mm thick biofilm after 6 days of culture, with characteristic tridimensional structures which converged to cover the biofilm surface. Moreover, *A. baumannii* ATCC17978 biofilm showed large amounts of extracellular DNA which could be involved in the maintenance of biofilm architecture.

7. A mutation of the AHL synthase gene *abaI* in *A. baumannii* ATCC17978 produced a significant reduction of biofilm biomass and impacted biofilm structure compared with the wild type strain. Moreover, the external addition of the main AHL produced by ATCC17978 restored the wild type biofilm in *abaI* mutant. These results suggest a role of QS regulation on biofilm formation in *A. baumannii*. In addition, the AHL lactonase Aii20J had a negative effect in the biofilm formation, supporting the use of this broad-spectrum QQ enzyme for virulence control of this pathogen.





RESUMEN/SUMMARY



Caracterización del sistema de quorum sensing en *Acinetobacter baumannii* y su influencia en la motilidad y en la formación de biopelícula.

Acinetobacter baumannii es un importante patógeno nosocomial Gram-negativo de especial interés debido a la rápida aparición de cepas multirresistentes. Aunque el género *Acinetobacter* incluye especies no patogénicas, un gran número de especies de *Acinetobacter*, que constituyen el complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* o ACB causan un gran número de infecciones humanas nosocomiales con especial relevancia en pacientes inmunodeprimidos y unidades de cuidados intensivos. Actualmente *A. baumannii* se encuentra entre los patógenos oportunistas más preocupantes a nivel clínico debido a su gran plasticidad genética para adquirir genes de resistencia a antibióticos y su formidable capacidad de supervivencia, constituyendo microecosistemas altamente organizados como las biopelículas (*biofilms*). Hay que añadir que la baja permeabilidad de su membrana celular y las bombas de expulsión de antibióticos contribuyen enormemente a la resistencia intrínseca de este patógeno. Debido a que globalmente *A. baumannii* se considera una de las bacterias más peligrosas para el ser humano, por el agotamiento de nuevos antibióticos para su tratamiento, entender los mecanismos que controlan la expresión de su virulencia es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias antipatogénicas contra este patógeno.

Entre los mecanismos de virulencia de *A. baumannii* destacan la motilidad y la formación de biopelícula. El control de ambos fenotipos tiene carácter multifactorial, interviniendo una red compleja de distintos factores, entre los que se encuentra el sistema de comunicación bacteriano dependiente de la densidad celular denominado *Quorum Sensing* (QS). El género *Acinetobacter* presenta un sistema de QS de tipo LuxI/LuxR, constituido por la sintasa de AHLs AbaI y el receptor AbaR, mediado por acil homoserín lactonas (AHLs). La mayor parte de la bibliografía relacionada con el QS en este género ha sido estudiada en *A. nosocomialis* M2, anteriormente clasificada como *A. baumannii*, en la cual la señal de QS mayoritaria es la *N*-hidroxidodecanoil-L-homoserín lactona o OHC12-HSL. Adicionalmente, se ha descrito que la sintasa AbaI activa fuertemente siete u ocho genes que funcionan como un operón de QS, relacionado con la producción de estas señales, tanto en *A. baumannii* como en *A. nosocomialis*. Diversos estudios han descrito la producción de AHLs en distintas cepas y especies de *Acinetobacter*, en su mayoría sin identificar inequívocamente las señales. Sin embargo en *A. baumannii* ATCC17978, que a pesar de no ser la cepa tipo, es la más utilizada en los laboratorios por haber sido la primera de la que se dispuso el genoma completo, el perfil de producción de AHLs y los factores que controlan la producción de las mismas no han sido estudiados hasta el momento. A pesar de que numerosos indicios indicaban que el QS está involucrado en la motilidad y en la formación de biopelícula de este patógeno, su papel exacto todavía estaba por determinar.

El objetivo de este trabajo fue, por lo tanto, caracterizar el sistema de QS de *A. baumannii* ATCC17978 y analizar su influencia sobre la motilidad y la producción de biopelícula. Adicionalmente, se estudió la presencia de actividad de degradación de señales de QS, un proceso denominado *Quorum Quenching* (QQ), en este patógeno y los resultados se compararon con la cepa *A. nosocomialis* M2 y otros aislados clínicos del género. Para ello se utilizaron mutantes de la sintasa de AHLs así como una lactonasa de QQ de amplio espectro, Aii20J, para determinar si las estrategias de QQ podrían ser viables para el control de la virulencia de *A. baumannii*.

En este estudio, revelamos que solamente las condiciones estáticas permiten la producción de AHLs en *A. baumannii* ATCC17978, así como en *A. nosocomialis* M2 y en el resto de cepas y aislados estudiados, indicando una relación entre las condiciones

que permiten la adherencia a superficie o el contacto célula-célula y el QS. En estas condiciones identificamos un perfil complejo de AHLs donde OHC12-HSL fue la señal mayoritaria en todos los aislados y cepas estudiados, además de pequeñas concentraciones de AHLs adicionales con variación intra e interespecífica. Confirmamos además, que AbaI es la única sintasa responsable de la producción de AHLs, ya que su mutación anula por completo la producción de AHLs. ATCC17978 y M2 presentaron un pico de producción de AHLs, entre las 17 y 24 horas del cultivo coincidiendo con el final de la fase logarítmica, tras el cual las señales disminuyeron drásticamente, incluso en condiciones de pH controlado, generando el primer indicio de que la actividad de QQ podría autorregular la producción de señales, hipótesis que se vería apoyada por la reciente identificación de una nueva enzima de QQ, AidA, en varios aislados clínicos de *A. baumannii*.

De este modo, investigamos la capacidad de degradación de señales en *A. baumannii* ATCC17978 a lo largo de la curva de crecimiento, observando una correlación entre la actividad QQ en biomasa y sobrenadante y la desaparición de las señales de QS. Esta actividad pudo ser confirmada en todas las cepas clínicas probadas, además de en *A. nosocomialis* M2, en la que AidA no está presente. La búsqueda en el genoma de *A. baumannii* ATCC17978 reveló que presenta varias enzimas putativas responsables de su actividad QQ, además de la α/β hidrolasa AidA. En total pudimos confirmar la existencia de tres nuevas enzimas de QQ de tipo lactonasa en ATCC17978, que subclonamos y sobre-expresamos en *Escherichia coli* para caracterizar su actividad. Todas ellas presentaron el dominio característico de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, aunque solo comparten entre un 20 y un 30% de homología a nivel de aminoácidos con la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp., representante de esta superfamilia. Además, mostraron en general, actividad QQ de amplio espectro, aunque con preferencia por AHLs de cadena larga. A pesar de que no encontramos ninguna enzima de tipo acilasa mediante la búsqueda bioinformática, los resultados indican la posible existencia de este tipo de enzimas de QQ que podrían ser excretadas al medio.

La motilidad asociada a superficie de *A. baumannii* ATCC17978 depende de la osmolaridad del sustrato, siendo modulada de forma secundaria por la disponibilidad de nutrientes. Los resultados confirmaron que el QS mediado por AHLs está directamente implicado en la producción de motilidad en esta especie, a diferencia de *A. nosocomialis* M2 en el que, al menos en las condiciones probadas, influyen otros factores. La lactonasa Aii20J fue capaz de inhibir la motilidad en ATCC17978, indicando su posible utilización para el control de este fenotipo.

En relación con la producción de biopelícula, comparamos diferentes modelos de formación de biopelícula, siendo el nuevo biorreactor de interfase el óptimo para el estudio de la formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, probablemente debido al gran aporte de oxígeno que requiere. En este biorreactor, ATCC17978 produjo una biopelícula consistente y gruesa que conseguimos caracterizar microscópicamente, observando unas características estructurales no descritas hasta el momento, como las estructuras tridimensionales esféricas a partir del tercer día de cultivo, que se agrupan en hileras continuas apiladas recubriendo toda la superficie o la enorme producción de ADN extracelular. Además, observamos que el sistema de QS también es esencial para la formación de este fenotipo en ATCC17978 y que la adición de la lactonasa Aii20J consiguió evitar la formación de biopelícula, confirmando una vez más su posible aplicación para el control de la virulencia de *A. baumannii*.

Caracterización do sistema de quorum sensing en *Acinetobacter baumannii* e a súa influencia na motilidade e na formación de biopelícula.

Acinetobacter baumannii é un importante patóxeno nosocomial Gram-negativo de especial interese debido á rápida aparición de cepas multirresistentes. Aínda que o xénero *Acinetobacter* inclúe especies non patoxénicas, un gran número de especies de *Acinetobacter*, que constitúen o complexo denominado *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* causan un gran número de infeccións humanas nosocomiais con especial relevancia en pacientes inmunodeprimidos e unidades de coidados intensivos. Actualmente *A. baumannii* encóntrase entre os patóxenos oportunistas máis preocupantes a nivel clínico debido á súa gran plasticidade xenética para adquirir xenes de resistencia a antibióticos e a súa formidable capacidade de supervivencia, constituíndo microecosistemas altamente organizados como as biopelículas (*biofilms*). Hai que engadir que a baixa permeabilidade da súa membrana celular e as bombas de expulsión de antibióticos contribúen enormemente á resistencia intrínseca deste patóxeno. Debido a que globalmente *A. baumannii* se considera unha das bacterias máis perigosas para o ser humano, polo esgotamento de novos antibióticos para o seu tratamento, entender os mecanismos que controlan a expresión da súa virulencia é crucial para o desenvolvemento de novas estratexias antipatoxénicas contra este patóxeno.

Entre os mecanismos de virulencia de *A. baumannii* destacan a motilidade e a formación de biopelícula. O control de ambos fenotipos ten carácter multifactorial, intervindo unha rede complexa de distintos factores, entre os que se atopa o sistema de comunicación bacteriano dependente da densidade celular denominado *Quorum Sensing* (QS). O xénero *Acinetobacter* presenta un sistema de QS de tipo LuxI/LuxR, constituído pola sintasa de AHLs AbaI e o receptor AbaR, mediado por acil homoserín lactonas (AHLs). A maior parte da bibliografía relacionada co QS neste xénero foi estudada en *A. nosocomialis* M2, anteriormente clasificada como *A. baumannii*, na cal o sinal de QS maioritario é a *N*-hidroxidodecanoil-L-homoserín lactona ou OHC12-HSL. Adicionalmente, describiuse que a sintasa AbaI activa fortemente sete ou oito xenes que funcionan como un operón de QS, relacionado coa produción destes sinais, tanto en *A. baumannii* como en *A. nosocomialis*. Diversos estudos describiron a produción de AHLs en distintas cepas e especies de *Acinetobacter*, na súa maioría sen identificar inequivocamente os sinais. No entanto, en *A. baumannii* ATCC17978, que a pesar de non ser a cepa tipo, é a máis utilizada nos laboratorios por ser a primeira da que se obtivo o xenoma completo, o perfil de produción de AHLs e os factores que controlan a produción das mesmas non foron estudados ata o momento. A pesar de que numerosos indicios indicaban que o QS está involucrado na motilidade e na formación de biopelícula deste patóxeno, o seu papel exacto aínda estaba por determinar.

O obxectivo deste traballo foi, polo tanto, caracterizar o sistema de QS de *A. baumannii* ATCC17978 e analizar a súa influencia sobre a motilidade e a produción de biopelícula. Adicionalmente, estudouse a presenza de actividade de degradación de sinais de QS, un proceso denominado *Quorum Quenching* (QQ) neste patóxeno e os resultados comparáronse coa cepa *A. nosocomialis* M2 e outros illados clínicos do xénero. Para isto utilizáronse mutantes da sintasa de AHLs así como unha lactonasa de QQ de amplo espectro, Aii20J, para determinar se as estratexias de QQ poderían ser viables para o control da virulencia de *A. baumannii*.

Neste estudo, revelamos que só as condicións estáticas permiten a produción de AHLs en *A. baumannii* ATCC17978, así como en *A. nosocomialis* M2 e no resto de cepas e illados estudados, indicando unha relación entre as condicións que permiten a adherencia á superficie ou o contacto célula-célula co o QS. Nestas condicións

identificamos un perfil complexo de AHLs onde OHC12-HSL foi o sinal maioritario en todos os illados e cepas estudados, ademais de pequenas concentracións de AHLs adicionais con variación intra- e interespecífica. Confirmamos ademais, que AbaI é a única sintasa responsable da produción de AHLs, xa que a súa mutación anula por completo a produción de AHLs. ATCC17978 e M2 presentaron un pico de produción de AHLs, entre as 17 e 24 horas de cultivo coincidindo co final da fase logarítmica, tras o cal os sinais diminuíron drasticamente, incluso en condicións de pH controlado, xerando o primer indicio de que a actividade de QQ podería autorregular a produción de sinais, hipótese que se vería respaldada pola recente identificación dunha nova enzima de QQ, AidA, en varios illados clínicos de *A. baumannii*.

Deste modo, investigamos a capacidade de degradación de sinais en *A. baumannii* ATCC17978 ao longo da curva de crecemento, observando unha correlación entre a actividade QQ en biomasa e sobrenadante e a desaparición dos sinais de QS. Esta actividade puido ser confirmada en todas as cepas clínicas probadas, ademais de en *A. nosocomialis* M2, na que AidA non está presente. A busca no xenoma de *A. baumannii* ATCC17978 revelou que presenta varias enzimas putativas responsables da súa actividade QQ, ademais da α/β hidrolasa AidA. En total puidemos confirmar a existencia de tres novas enzimas de QQ de tipo lactonasa en ATCC17978, que subclonamos e sobre-expresamos en *Escherichia coli* para caracterizar a súa actividade. Todas elas presentaron o dominio característico da superfamilia das metalo- β -lactamasas, aínda que só comparten entre un 20 e un 30% de homoloxía a nivel de aminoácidos coa lactonasa AiiA de *Bacillus* sp., representante desta superfamilia. Ademais, mostraron en xeral, actividade QQ de amplo espectro, aínda que con preferencia por AHLs de cadea longa. A pesar de que non atopamos ningunha enzima de tipo acilasa mediante a busca bioinformática, os resultados indican a posible existencia deste tipo de enzimas de QQ que poderían ser excretadas ao medio.

A motilidade asociada á superficie de *A. baumannii* ATCC17978 depende da osmolaridade do substrato, sendo modulada de forma secundaria pola dispoñibilidade de nutrientes. Os resultados confirmaron que o QS mediado por AHLs está directamente implicado na produción de motilidade nesta especie, a diferenza de *A. nosocomialis* M2 no que, polo menos nas condicións probadas, inflúen outros factores. A lactonasa Aii20J foi capaz de inhibir a motilidade en ATCC17978, indicando a súa posible utilización para o control deste fenotipo.

En relación coa produción de biopelícula, comparamos diferentes modelos de formación de biopelícula, sendo o novo biorreactor de interfase o óptimo para o estudo da formación de biopelícula de *A. baumannii* ATCC17978, probablemente debido ao grande aporte de osíxeno que precisa. Neste biorreactor, ATCC17978 produciu unha biopelícula consistente e grosa que conseguimos caracterizar microscopicamente, observando unhas características estruturais non descritas ata o momento, como as estruturas tridimensionais esféricas a partir do terceiro día de cultivo, que se agrupan en ringleiras continuas apiladas recubriendo toda a superficie ou a enorme produción de ADN extracelular. Ademais, observamos que o sistema de QS tamén é esencial para a formación deste fenotipo en ATCC17978 e que a adición da lactonasa Aii20J conseguiu evitar a formación de biopelícula, confirmando unha vez máis a súa posible aplicación para o control da virulencia de *A. baumannii*.

Characterization of quorum sensing system in *Acinetobacter baumannii* and its influence on motility and biofilm formation.

Acinetobacter baumannii is an important Gram-negative nosocomial pathogen of special interest due to the emergence and widespread of antibiotic resistance. Although the genus *Acinetobacter* comprises non-pathogenic species, numerous species belonging to the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* or ACB complex cause several nosocomial infections, mostly in immunocompromised patients hospitalized in intensive care units. Currently, the clinical interest of *A. baumannii* is rising owing to its high ability to acquire antibiotic resistant genes and its formidable surviving capacity as biofilm former. Moreover, the low permeability of its cell membrane and the presence of antibiotic efflux pumps in this species contribute significantly to the intrinsic antibiotic resistance of *Acinetobacter*. Due to the lack of effective treatment choices, *A. baumannii* is considered one of the most dangerous human pathogens worldwide; therefore, a more thorough comprehension of its virulence control mechanisms is essential to the development of new anti-pathogenic strategies against this pathogen.

Among the virulence factors that contribute to *A. baumannii* pathogenesis, motility and biofilm formation are at the outmost importance. The control of both phenotypes is multifactorial, involving several regulatory networks and including the cell density-dependent communication system known as Quorum Sensing (QS). *Acinetobacter* presents a typical LuxI/LuxR-type QS network involving the acyl homoserine lactone (AHL) synthase AbaI and receptor AbaR. Earlier studies using *A. nosocomialis* M2, previously classified as *A. baumannii*, have described *N*-hydroxydodecanoyl-L-homoserine lactone or OHC12-HSL as the main signal used for QS. Moreover, AHL signal production has been associated with the activation of the QS operon comprising seven to eight genes in *A. baumannii* and *A. nosocomialis*. Although different reports have described QS signal production without chemical characterisation in other species and strains of *Acinetobacter*, the AHL profile and influence on virulence factor expression of the reference strain *A. baumannii* ATCC17978 have not been elucidated yet.

The objective of this work was to characterize the QS system of *A. baumannii* ATCC17978 and analyze its influence on motility and biofilm formation. We also studied the presence of QS signals enzymatic degradation activity, a process termed as Quorum Quenching (QQ), in this pathogen, *A. nosocomialis* M2 and other clinical isolates. Mutants of the AHL synthase, as well as the wide-spectrum AHL-lactonase Aii20J, were also studied in order to determinate if QQ strategies could be used for virulence control of *A. baumannii*.

In this work, a link between surface adherence of *A. baumannii* ATCC17978 and QS regulation has been revealed since only growth under static conditions allowed AHL production in this species, as well as in *A. nosocomialis* M2 and other clinical isolates tested. In these conditions, a complex AHL profile was identified, with OHC12-HSL as the main signal synthesized by all strains tested and some degree of intra- and interspecies variation in the minor AHLs produced. Moreover, we confirmed that AbaI is the only synthase responsible for AHL production in ATCC17978, since *abaI* mutation abolished AHL synthesis completely. AHL production peaked at the late exponential growth phase (17-24 hours) in ATCC17978 and M2. Afterwards, a sharp drop in AHL concentration was recorded, even under controlled pH culture conditions, suggesting clearance of own QS signals by QQ activity. This result is supported by the recent discovery of the QQ enzyme AidA in *A. baumannii*.

To investigate this further, QQ activity of biomass and cell free culture supernatants of *A. baumannii* ATCC17978 was assessed over time. Results showed a correlation between QQ activity of biomass and supernatants and AHL turnover. AHL-degradation activity was also confirmed in all clinical isolates tested and M2, where no homolog to *aidA* gene was found. Besides *AidA*, an *in silico* analysis of ATCC17978 genome revealed several genes encoding putative QQ enzymes in this pathogen. From these, three new lactonases could be confirmed as AHL-degrading enzymes by heterologous gene expression in *Escherichia coli*. Although they only share between 20 and 30% sequence identity with the *Bacillus* sp. AHL-lactonase AiiA, all lactonases contain the characteristic domain of the metallo- β -lactamase superfamily. Moreover, ATCC17978 lactonases exhibited wide spectrum QQ activity, although with preference for long-chain AHLs. No AHL-acylase could be identified in ATCC17978 genome, however, results suggest the presence of this enzymatic activity in cell free culture supernatants of this pathogen.

Surface-associated motility of *A. baumannii* ATCC17978 depends on the osmolality of the environment and is modulated by nutrient availability. Under tested conditions and in contrast to *A. nosocomialis* M2, AHL-mediated QS is required for surface motility in *A. baumannii* ATCC17978. Moreover, the wide-spectrum QQ lactonase Aii20J was able to inhibit surface motility in ATCC17978, suggesting its potential for control of this trait.

Different models for biofilm formation were evaluated and a new interface bioreactor system was selected as optimal for biofilm development studies in *A. baumannii* ATCC17978, probably due to the high aeration required by biofilms of this species. The consistent and robust biofilms obtained allowed structural studies over time and revealed the formation of new structures not described to date, particularly the formation of strings of spherical aggregates on the biofilm surface after 3 days of biofilm culture. Moreover, large amounts of extracellular DNA, with probable cohesive or scaffolding functions, were observed in all stages of biofilm development. Consistent with motility results, QS is also essential for biofilm formation in ATCC17978 and the addition of Aii20J lactonase reduced biofilm formation significantly, confirming its potential as anti-pathogenic strategy against *A. baumannii*.



BIBLIOGRAFÍA



- Adams MD, Chan ER, Molyneaux ND, Bonomo RA.** 2010. Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**:3569-3577. doi: 10.1128/AAC.00057-10.
- Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, MacDonald IJ, Martin KM, Russo T, Campagnari AA, Hujer AM, Bonomo RA, Gill SR.** 2008. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* **190**:8053-8064. doi: 10.1128/JB.00834-08.
- Allen CL, Gullik AM.** 2014. Structural and bioinformatics characterization of an *Acinetobacter baumannii* type II carrier protein. *Acta Crystallogr D Biol.* **70**:1718-1725. doi: 10.1107/S1399004714008311.
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjerlleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* and biofilms. *Mol Microbiol.* **59**:1114-1128.
- Alsharif G, Ahmad S, Islam MS, Shah R, Busby SJ, Krachler AM.** 2015. Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Proc Natl Acad Sci USA.* **112**:5503-5508. doi: 10.1073/pnas.1422986112.
- Álvarez-Fraga L, Vázquez-Ucha JC, Martínez-Gutián M, Vallejo JA, Bou G, Beceiro A, Poza M.** 2018. Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence.* **9**:496-509. doi: 10.1080/21505594.2017.1420451.
- Álvarez-Fraga L, Pérez A, Rumbo-Feal S, Merino M, Vallejo JA, Ohneck EJ, Edelmann RE, Beceiro A, Vázquez-Ucha JC, Valle J, Actis LA, Bou G, Poza M.** 2016. Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence.* **7**:443-455. doi: 10.1080/21505594.2016.1145335.
- Alves S, Duarte A, Sousa S, Domingues FC.** 2016. Study of the major essential oil compounds of *Coriandrum sativum* against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. *Biofouling.* **32**:155-165. doi: 10.1080/08927014.2015.1133810.
- Amara N, Krom BP, Kaufmann GF, Meijler MM.** 2011. Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond. *Chem Rev.* **111**:195-208. doi: 10.1021/cr100101c.
- Anbzhagan D, Mansor M, Yan GO, Md Yusof MY, Hassan H, Sekaran SD.** 2012. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *PLoS One.* **7**(7):e36696. doi: 10.1371/journal.pone.0036696.

Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. 2011. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS One. 6(8):e22674. doi: 10.1371/journal.pone.0022674.

Antunes LC, Visca P, Towner KJ. 2014. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathog Dis. 71:292-301. doi: 10.1111/2049-632X.12125.

Arivett BA, Fiester SE, Ream DC, Centrón D, Ramírez MS, Tolmasky ME, Actis LA. 2015. Draft Genome of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain A155 clinical isolate. Genome Announc. 3(2). pii: e00212-15. doi: 10.1128/genomeA.00212-15.

Barber CE, Tan JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJ, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. Mol Microbiol. 24:555-566.

Barker J, Maxted H. 1975. Observations on the growth and movement of *Acinetobacter* on semi-solid media. J Med Microbiol. 8:443-446.

Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. 1968. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol. 95:1520-1541.

Bebrone C. 2007. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. Biochem Pharmacol. 74:1686-1701.

Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 9:148-165.

Betancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litrán T. 2012. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. 194:3950-3960. doi: 10.1128/JB.06769-11.

Bhargava N, Sharma P, Capalash N. 2010. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. Crit Rev Microbiol. 36:349-360. doi: 10.3109/1040841X.2010.512269.

Bhargava N, Sharma P, Capalash N. 2012. *N*-acyl homoserine lactone mediated interspecies interactions between *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. Biofouling. 28:813-822. doi: 10.1080/08927014.2012.714372.

Bhargava N, Sharma P, Capalash N. 2014. Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. Infect Immun. 82:3417-3425. doi: 10.1128/IAI.01600-14.

Bhargava N, Singh SP, Sharma A, Sharma P, Capalash N. 2015. Attenuation of quorum sensing-mediated virulence of *Acinetobacter baumannii* by *Glycyrrhiza glabra* flavonoids. Future Microbiol. 10:1953-1968. doi: 10.2217/fmb.15.107.

Bijtenhoorn P, Mayerhofer H, Müller-Dieckmann J, Utpatel C, Schipper C, Hornung C, Szesny M, Grond S, Thurner A, Brzuszkiewicz E, Daniel R, Dierking K, Schulenburg H, Streit WR. 2011. A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. PLoS ONE 6(10): e26278. doi:10.1371/journal.pone.0026278.

Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. 2000. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metab Dispos. 28:1335-1341.

Biswa P, Doble M. 2013. Production of acylated homoserine lactone by gram-positive bacteria isolated from marine water. FEMS Microbiol Lett. 343:34-41. doi:10.1111/1574-6968.12123.

Bitrian M, Solari CM, González RH, Nudel CB. 2012. Identification of virulence markers in clinically relevant strains of *Acinetobacter* genospecies. Int Microbiol. 15:79-88. doi: 10.2436/20.1501.01.161.

Böckelmann U, Janke A, Kuhn R, Neu TR, Wecke J, Lawrence JR, Szewzyk U. 2006. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. FEMS Microbiol Lett. 262:31-38. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00361.x.

Bokhove M, Nadal Jimenez P, Quax WJ, Dijkstra BW. 2010. The quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. Proc Natl Acad Sci USA. 107:686-691. doi: 10.1073/pnas.0911839107.

Bonomo RA, Szabo D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 43:S49-56. doi: 10.1086/504477.

Borchardt SA, Allain EJ, Michels JJ, Stearns GW, Kelly RF, McCoy WF. 2001. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. Appl Environ Microbiol. 67:3174-3179. doi: 10.1128/AEM.67.7.3174-3179.2001.

Bouvet PJ, Grimont PA. 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann Inst Pasteur Microbiol. 138:569-578.

Bouvet PJ, Jeanjean S. 1989. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res Microbiol. 140:291-299.

Bouvet PJM, Grimont PAD. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol. 36:228-240.

Brisou J, Prevot AR. 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. Ann Inst Pasteur. 86:722-728.

Brossard KA, Campagnari AA. 2012. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun.* **80**:228-233. doi: 10.1128/IAI.05913-11.

Cao Y, He S, Zhou Z, Zhang M, Mao W, Zhang H, Yao B. 2012. Orally administered thermostable *N*-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. strain AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish. *Appl Environ Microbiol.* **78**:1899–1908. doi: 10.1128/AEM.06139-11.

Carlier A, Uroz S, Smadja B, Fray R, Latour X, 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.

Carruthers MD, Harding CM, Baker BD, Bonomo RA, Hujer KM, Rather PN, Munson RS Jr. 2013. Draft genome sequence of the clinical isolate *Acinetobacter nosocomialis* strain M2. *Genome Announc.* 1(6). pii: e00906-13. doi: 10.1128/genomeA.00906-13.

Cerqueira GM, Kostoulias X, Khoo C, Aibinu I, Qu Y, Traven A, Peleg AY. 2014. A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. *J Infect Dis.* **210**:46-55. doi: 10.1093/infdis/jiu024.

Chan KG, Atkinson S, Mathee K, Sam CK, Chhabra SR, Cámara M, Koh CL, Williams P. 2011. Characterization of *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiol.* **11**:51. doi: 10.1186/1471-2180-11-51.

Chan KG, Cheng HJ, Chen JW, Yin WF, Ngeow YF. 2014. Tandem mass spectrometry detection of quorum sensing activity in multidrug resistant clinical isolate *Acinetobacter baumannii*. *Scientific WorldJournal.* 2014:891041. doi:10.1155/2014/891041.

Chang KC, Kuo HY, Tang CY, Chang CW, Lu CW, Liu CC, Lin HR, Chen KH, Liou ML. 2014. Transcriptome profiling in imipenem-selected *Acinetobacter baumannii*. *BMC Genomics.* **15**:815. doi: 10.1186/1471-2164-15-815.

Chen R, LV R, Xiao L, Wang M, Du Z, Tan Y, Cui Y, Yan Y, Luo Y, Yang R, Song Y. 2017. A1S_2811, a CheA/Y-like hybrid two-component regulator from *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, is involved in surface motility and biofilm formation in this bacterium. *Microbiologyopen.* 6(5). doi: 10.1002/mbo3.510.

Chen R, Zhou Z, Cao Y, Bai Y, Yao B. 2010. High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microb Cell Fact.* **9**:39. doi: 10.1186/1475-2859-9-39.

Chen TL, Lee YT, Kuo SC, Yang SP, Fung CP, Lee SD. 2014. Rapid identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a multiplex PCR assay. *J Med Microbiol.* **63**:1154-1159. doi: 10.1099/jmm.0.071712-0.

Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. 2009. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol.* **191**:5953-5963. doi: 10.1128/JB.00647-09.

Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC. 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol.* **7**:1127-1138. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x.

Chow JY, Wu L, Yew WS. 2009. Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry.* **48**:4344-4353. doi: 10.1021/bi9004045.

Chow JY, Xue B, Lee KH, Tung A, Wu L, Robinson RC, Yew WS. 2010. Directed evolution of a thermostable quorum-quenching lactonase from the amidohydrolase superfamily. *J Biol Chem.* **285**:40911-40920. doi: 10.1074/jbc.M110.177139.

Chow JY, Yang Y, Tay SB, Chua KL, Yew WS. 2014. Disruption of biofilm formation by the human pathogen *Acinetobacter baumannii* using engineered quorum-quenching lactonase. *Antimicrob Agent Chemother.* **58**:1802-1805. doi: 10.1128/AAC.02410-13.

Chowdhary PK, Keshavan N, Nguyen HQ, Peterson JA, González JE, Haines DC. 2007. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry.* **46**:14429-14437. doi: 10.1021/bi701945j.

Chu YW, Leung CM, Houand ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY, Cheng AF. 1999. Skin carriage of *Acinetobacters* in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* **37**:2962-2967.

Cihalova K, Chudobova D, Michalek P, Moulick A, Guran R, Kopel P, Adam V, Kizek R. 2015. *Staphylococcus aureus* and MRSA growth and biofilm formation after treatment with antibiotics and SeNPs. *Int J Mol Sci.* **16**:24656-24672. doi: 10.3390/ijms161024656.

Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. 2011. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiol.* **157**:2534-2544. doi: 10.1099/mic.0.049791-0.

Cobrado L, Silva-Dias A, Azevedo MM, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2013. In vivo antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother.* **68**:126-130. doi: 10.1093/jac/dks376.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**:1318-1322.

Czajkowski R, Krzyżanowska D, Karczewska J, Atkinson S, Przysowa J, Lojkowska E, Williams P, Jafra S. 2011. Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum* sp. A44 depends on the activity of a novel class of AHL acylase. *Environ Microbiol Rep.* **3**:59-68. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00188.x.

Dafopoulou K, Xavier BB, Hotterbeekx A, Janssens L, Lammens C, Dé E, Goosens H, Tsakris A, Malhotra-Kumar S, Pournaras S. 2016. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains with deficient biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* **60**:1892-1895. doi: 10.1128/AAC.02518-15.

Davenport EK, Call DR, Bevenal H. 2014. Differential protection from tobramycin by extracellular polymeric substances from *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**:4755-4761. doi: 10.1128/AAC.03071-14.

Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* **185**:1027-1036.

de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, Wolterbeek R, van den Broek P, Nibbering P. 2010. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS One.* **5**(5):e10732. doi: 10.1371/journal.pone.0010732.

de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, Actis L, Nibbering P, Dijkshoorn L. 2009. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 (T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol.* **160**:213-218. doi: 10.1016/j.resmic.2009.01.002.

De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C, Iglewski BH. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol.* **67**:1865-1873.

Defoirdt T, Crab R, Wood TK, 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. doi: 10.1128/AEM.00753-06.

Dijshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* **5**:939-951. doi: 10.1038/nrmicro1789.

Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. 2002. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.* **68**:1754-1759. doi: 10.1128/AEM.68.4.1754-1759.2002.

- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zang XF, Zhang LH.** 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature*. **411**:813-817.
- Dong YH, Wang LY, Zhang LH.** 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc B*. **362**:1201-1211. doi: 10.1038/35081101.
- Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH.** 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. doi: 10.1073/pnas.060023897.
- Dong YH, Zhang LH.** 2005. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol*. **43**:101-109.
- Dorsey CW, Beglin MS, Actis LA.** 2003. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. **41**:4188-4193.
- Dou Y, Song F, Guo F, Zhou Z, Zhu C, Xiang J, Huan J.** 2017. *Acinetobacter baumannii* quorum-sensing signaling molecule induces the expression of drug-resistance genes. *Mol Med Rep*. **15**:4061-4068. doi: 10.3892/mmr.2017.6528.
- Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN.** 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2 and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res*. **46**:1239-1247. doi: 10.1194/jlr.M400511-JLR200.
- Dubern JF, Diggle SP.** 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst*. **4**:882-888. doi: 10.1039/b803796p.
- Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH.** 2011a. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*. **12**:126. doi: 10.1186/1471-2164-12-126.
- Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Elbourne LD, Paulsen IT, Brown MH.** 2013. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun*. **81**:2574-2783. doi: 10.1128/IAI.00065-13.
- Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH.** 2011b. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. **323**:44-51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x.
- Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH.** 2014. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Genomics*. **15**:1020. doi: 10.1186/1471-2164-15-1020.

Erdönmez D, Rad AY, Aksöz N. 2017. Quorum sensing molecules production by nosocomial and soil isolates *Acinetobacter baumannii*. Arch Microbiol. **199**:1325-1334. doi: 10.1007/s00203-017-1408-8.

Exterkate RA, Crielaard W, Ten Cate JM. 2010. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. Caries Res. **44**:372-379. doi: 10.1159/000316541.

Ferrer MD, Rodriguez JC, Álvarez L, Artacho A, Royo G, Mira A. 2016. Effect of antibiotics on biofilm inhibition and induction measured by real-time cell analysis. J Appl Microbiol. **122**:640-650. doi: 10.1111/jam.13368.

Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanaceum*. Mol Microbiol. **26**: 251-259.

Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. **8**:623-633. doi: 10.1038/nrmicro2415.

Fournier PE, Richet H. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis. **42**:692-699. doi: 10.1086/500202.

Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet. **2**(1):e7. 10.1371/journal.pgen.0020007.

Fuqua C, Greenberg EP. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. Nature Rev. **3**:685-695. doi: 10.1038/nrm907.

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.

Gaddy JA, Actis LA. 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Future Microbiol. **4**:273-278. doi: 10.2217/fmb.09.5.

Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun. **77**:3150-3160. doi: 10.1128/IAI.00096-09.

Gawande PV, Leung KP, Madhyastha S. 2014. Antibiofilm and antimicrobial efficacy of DispersinB®-KSL-W peptide-based wound gel against chronic wound infection associated bacteria. Curr Microbiol. **68**:635-641. doi: 10.1007/s00284-014-0519-6.

- Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G.** 2014. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* **13**:460-476. doi: 10.1021/pr400603f.
- Gentile V, Frangipani E, Bonchi C, Minandri F, Runci F, Visca P.** 2014. Iron and *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Pathogens.* **3**:704-719. doi: 10.3390/pathogens3030704.
- Gerner-Smidt P, Tjenberg I, Ursing J.** 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol.* **29**:277-82.
- Gerner-Smidt P, Tjenberg I.** 1993. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS.* **101**:826-32.
- Giles SK, Stroehler UH, Eijkelkamp BA, Brown MH.** 2015. Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* **15**:116. doi: 10.1186/s12866-015-0440-6.
- 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 signaling. *J Bacteriol.* **178**:6618-6622.
- Golic A, Vanechoutte M, Nemeč A, Viale AM, Actis LA, Mussi MA.** 2013. Staring at the cold sun: blue light regulation is distributed within the genus *Acinetobacter*. *PLoS One.* **8**(1):e55059. doi: 10.1371/journal.pone.0055059.
- Gong Y, Tian XL, Sutherland T, Sisson G, Mai J, Ling J, Li YH.** 2009. Global transcriptional analysis of acid-inducible genes in *Streptococcus mutans*: multiple two-component systems involved in acid adaptation. *Microbiology.* **155**:3322-3332. doi: 10.1099/mic.0.031591-0.
- González RH, Dijkshoorn L, Van den Barselaar M, Nudel C.** 2009. Quorum sensing profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. *Rev Argent Microbiol.* **41**:73-78.
- González RH, Nusblat A, Nudel BC.** 2001. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res.* **155**:271-277. doi: 10.1016/S0944-5013(01)80004-5.
- Gopal R, Kim YG, Lee JH, Lee SK, Chae JD, Son BK, Seo CH, Park Y.** 2014. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**:1622-1629. doi: 10.1128/AAC.02473-13.
- Greene C, Wu J, Rickard AH, Xi C.** 2016. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. **63**:233-239. doi: 10.1111/lam.12627.

Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P. 2013. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian J Crit Care Med.* **17**:214-218. doi: 10.4103/0972-5229.118416.

Haagensen JA, Hansen SK, Christensen BB, Pamp SJ, Molin S. 2015. Development of spatial distribution patterns by biofilm cells. *Appl Environ Microbiol.* **81**:6120-6128. doi: 10.1128/AEM.01614-15.

Haudecoeur E, Faure D. 2010. A fine control of quorum-sensing communication in *Agrobacterium tumefaciens*. *Commun Integr Biol.* **3**:84-88.

Hansen SK, Haagensen JA, Gjermansen M, Jørgensen TM, Tolker-Nielsen T, Molin S. 2007. Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *J Bacteriol.* **189**:4932-4943. doi:10.1128/JB.00041-07

Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS Jr. 2013. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio.* pii:e00360-13. doi: 10.1128/mBio.00360-13.

Harshey RM, Matsuyama T. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**:8631-8635.

He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J, Cheng H, Cao J, Lu G. 2015. Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**:4817-4825. doi: 10.1128/AAC.00877-15.

Heindorf M, Kadari M, Heider C, Skiebe E, Wilharm G. 2014. Impact of *Acinetobacter baumannii* superoxide dismutase on motility, virulence, oxidative stress resistance and susceptibility to antibiotics. *PLoS One.* **9**(7):e101033. doi: 10.1371/journal.pone.0101033.

Henrichsen J, Blom J. 1975. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* **83**:103-115.

Henrichsen J. 1983. Twitching motility. *Annu Rev Microbiol.* **37**:81-93.

Henrichsen J. 1984. Not gliding but twitching motility of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Clin Pathol.* **37**:102-103.

Herbert D, Phipps PJ, Strano RE. 1971. Chemical analysis of microbial cells. In: *Methods in Microbiology.* Norris JR and Ribbons DW (eds). Acad Press. pp. 209-344.

Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* **35**:322-332. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

Hood MI, Jacobs AC, Sayood K, Dunman PM, Skaar EP. 2010. *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**:1029-1041. doi: 10.1128/AAC.00963-09.

Hook AL, Chang CY, Yang J, Luckett J, Cockayne A, Atkinson S, Mei Y, Bayston R, Irvine DJ, Langer R, Anderson DG, Williams P, Davies MC, Alexander MR. 2012. Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nat Biotechnol.* **30**:868-875. doi: 10.1038/nbt.2316.

Houang ET, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, Cheng AF. 2001. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* **39**:228-234. doi: 10.1128/JCM.39.1.228-234.2001.

How KY, Hong KW, Sam CK, Koh CL, Yin WF, Chan KG. 2015. Unravelling the genome of long chain *N*-acylhomoserine lactone-producing *Acinetobacter* sp. strain GG2 and identification of its quorum sensing synthase gene. *Front Microbiol.* **6**:240. doi: 10.3389/fmicb.2015.00240.

Howard A, O'Donogue M, Feeney A, Sleator RD. 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* **3**:243-250. doi: 10.4161/viru.19700.

Huang CJ, Lin Y, Yi S, Liu P, Shen J, Shao Z, Liu Z. 2012. QsdH, a novel AHL lactonase in the RND-Type inner membrane of marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* strain 1A01261. *PLoS ONE.* **7**: e46587. doi:10.1371/journal.pone.0046587.

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. doi: 10.1128/AEM.72.2.1190-1197.2006.

Huang YL, Ki JS, Case RJ, Quian PY. 2008. Diversity and acyl-homoserine lactone production among subtidal biofilm-forming bacteria. *Aquat Microb Ecol.* **52**:185-193.

Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, Bonnal RJ, Sicheritz-Ponten T, De Bellis G, Visca P, Cassone A, Carattoli A. 2008. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:2616-2625. doi: 10.1128/AAC.01643-07.

Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, Scott NE, Vinogradov E, Stratilo C, Reiz B, Cordwell SJ, Whittall R, Schild S, Feldman MF. 2012. Identification of a general *O*-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog.* **8**(6):e1002758. doi: 10.1371/journal.ppat.1002758.

Jamal MA, Rosenblatt JS, Hachem RY, Ying J, Pravinkumar E, Nates JL, Chaftari AM, Raad II. 2014. Prevention of biofilm colonization by Gram-negative bacteria on minocycline-rifampin-impregnated catheters sequentially coated with chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**:1179-1182. doi: 10.1128/AAC.01959-13.

Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol.* **36**:1938-1941.

Joly-Guillou ML. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect.* **11**:868-873.

Jung J, Baek JH, Park W. 2010. Complete genome sequence of the diesel-degrading *Acinetobacter* sp. strain DR1. **192**:4794-4795. doi: 10.1128/JB.00722-10.

Jung J, Park W. 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* **99**:2533-2548. doi: 10.1007/s00253-015-6439-y.

Kalia VC, Rahu SC, Purohit HJ. 2011. Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and -lactonase. *Open Microbiol J.* **5**:1-13. doi: 10.2174/1874285801105010001.

Kang BR, Lee JH, Ko SJ, Lee YH, Cha JS, Cho BH, Kim YC. 2004. Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. *Can J Microbiol.* **50**:935-941.

Kang YS, Park W. 2010a. Contribution of quorum-sensing system to hexadecane degradation and biofilm formation in *Acinetobacter* sp. strain DR1. *J Appl Microbiol.* **109**:1650-1659. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04793.x.

Kang YS, Park W. 2010b. Trade-off between antibiotic resistance and biological fitness in *Acinetobacter* sp. strain DR1. *Environ Microbiol.* **12**:1304-1318. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02175.x.

Kaufman 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-*N*-acylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**:309-314.

Khersonsky O, Tawfik DS. 2005. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry.* **44**:6371-6382. doi: 10.1021/bi047440d.

Kim AL, Park SY, Lee CH, Lee CH, Lee JK. 2014. Quorum quenching bacteria isolated from sludge of a wastewater treatment plant and their application for controlling biofilm formation. *J Microbiol Biotechnol.* **24**:1574-1582.

Kim J, Park W. 2013. Identification and characterization of genes regulated by AqsR, a LuxR-type regulator in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**:6967-6978. doi: 10.1007/s00253-013-5006-7.

Kjelleberg S, McDouglad D, Rasmussen TB, Givskov M. 2008. Quorum-sensing inhibition. In: *Chemical Communication Among Bacteria*. Winans SC and Bassler BL eds. Washington, DC. pp. 393-416.

Krysciak D, Schmeisser C, Preuss S, Riethausen J, Quitschau M, Grond S, Streit WR. 2011. Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer I molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp. strain NGR234. *Appl Environ Microbiol.* **77**:5089–5099. doi: 10.1128/AEM.00112-11.

La Scola B, Fournier PE, Brouqui P, Raoult D. 2001. Detection and culture of *Bartonella quintana*, *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter* spp. from decontaminated human body lice. *J Clin Microbiol.* **39**:1707-1709. doi: 10.1128/JCM.39.5.1707-1709.2001

La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol.* **44**:827-832. doi: 10.1128/JCM.44.3.827-832.2006.

LaSarre B, Federle MJ. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* **77**:73–111. doi: 10.1128/MMBR.00046-12.

Leadbetter JR, Greenberg EP. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol.* **182**:6921-6926.

Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* **14**:49-54.

Lee JS, Choi CH, Kim JW, Lee JC. 2010. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *J Microbiol.* **48**:387-392. doi: 10.1007/s12275-010-0155-1.

Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J, Dijkshoorn L. 2006. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol.* **157**:360-366.

Lee J, Zhang L. 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* **6**:26-41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x.

Lees-Miller RG, Iwashkiw JA, Scott NE, Seper A, Vinogradov E, Schild S, Feldman MT. 2013. A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. *Mol Microbiol.* **89**:816-830. doi: 10.1111/mmi.12300.

- Lequette Y, Greenberg EP.** 2005. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* **187**:37-44.
- 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.
- Liu C, Guo S, Turak A, Zhang J, Zhang L.** 2017. AidE encodes an *N*-acyl homoserine lactonase in *Acinetobacter*. **33**:1625-1639. doi: 10.13345/j.cjb.170156.
- Liu D, Momb J, Thomas PW, Moulin A, Petsko GA, Fast W, Ringe D.** 2008. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-bound structures. *Biochemistry.* **47**:7706-7714. doi: 10.1021/bi800368y.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* **25**:402-408.
- Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA.** 2008. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol.* **190**:1036-1044.
- Longo F, Vuotto C, Donelli G.** 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* **37**:119-127.
- López M, Mayer C, Fernández-García L, Blasco L, Muras A, Ruiz FM, Bou G, Otero A, Tomás M, GEIH-GEMARA (SEIMC).** 2017. Quorum sensing network in clinical strains of *A. baumannii*: AidA is a new quorum quenching enzyme. *Plos One*, 12(3): e0174454. doi: 10.1371/journal.pone.0174454.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**:265-275.
- Luo LM, Wu LJ, Xiao YL, Zhao D, Chen ZX, Kang M, Zhang Q, Xie Y.** 2015. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. *BMC Microbiol.* **15**:62. doi: 10.1186/s12866-015-0397-5.
- Magennis EP, Hook AL, Davies MC, Alexander C, Williams P, Alexander MR.** 2015. Engineering serendipity: High-throughput discovery of materials that resist bacterial attachment. *Acta Biomater.* **34**:84-92. doi: 10.1016/j.actbio.2015.11.008.
- Magnet S, Courvalin P, Lambert T.** 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:3375-3380. doi: 10.1128/AAC.45.12.3375-3380.2001.

- Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T.** 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:3298-3304.
- Martí S, Rodríguez-Baño J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, Dé E.** 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter species*. *BMC Res Notes.* **4**:5. doi: 10.1186/1756-0500-4-5.
- Mayer C, Romero M, Muras A, Otero A.** 2015. Aii20J, a wide-spectrum thermostable *N*-acylhomoserine lactonase from the marine bacterium *Tenacibaculum* sp. 20J, can quench AHL-mediated acid resistance in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **99**:9523-9539. doi: 10.1007/s00253-015-6741-8.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Cámara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, 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.
- McQueary CN, Actis LA.** 2011. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol.* **49**:243-250. doi: 10.1007/s12275-011-0343-7.
- McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW, Zurawski DV.** 2012. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter* surface-associated motility. *J Microbiol.* **50**:434-443. doi: 10.1007/s12275-012-1555-1.
- Mei GY, Yan XX, Turak A, Luo ZQ, Zhang LQ.** 2010. AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel *N*-acylhomoserine lactonase. *Appl Environ Microbiol.* **76**:4933-4942. doi: 10.1128/AEM.00477-10.
- Merone L, Mandrich L, Rossi M, Manco G.** 2005. A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties. *Extremophiles.* **9**:297-305.
- Miller MB, Bassler BL.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **55**:165-199.
- Milton D, Chalker V, 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.
- Minagawa S, Inami H, Kato T, Sawada S, Yasuki T, Miyairi S, Horikawa M, Okuda J, Gotoh N.** 2012. RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* **12**:70.

- Momb J, Wang C, Liu D, Thomas PW, Petsko GA, Guo H, Ringe D, Fast W.** 2008. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. Substrate modeling and active site mutations. *Biochemistry*. **47**:7715-7725. doi: 10.1021/bi800368y.
- Morohoshi T, Ebata A, Nakazawa S, Kato N, Ikeda T.** 2005. *N*-acyl homoserine lactone-producing or -degrading bacteria isolated from the intestinal microbial flora of ayu fish (*Plecoglossus altivelis*). *Microbes Environ*. **20**:264 –268. doi: 10.1264/jsme2.20.264.
- Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T.** 2008a. *N*-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC12472. *FEMS Microbiol Lett*. **279**:124-130. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x.
- Morohoshi T, Nakazawa S, Ebata A, Kato N, Ikeda T.** 2008b. Identification and characterization of *N*-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. *Biosci Biotechnol Biochem*. **72**:1887-1893.
- Morohoshi T, Someya N, Ikeda T.** 2009. Novel *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. *Biosci Biotechnol Biochem*. **73**:2124 –2127. doi: 10.1271/bbb.90283.
- Morohoshi T, Tominaga Y, Someya N, Ikeda T.** 2012. Complete genome sequence and characterization of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. *J Biosci Bioeng*. **113**:20–25. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.006.
- Mukerji S, Bhopale N.** 1983. Gliding motility of *Acinetobacter anitratus*. *J Clin Pathol* **36**:484.
- Muras A, López-Pérez M, Mayer C, Parga A, Amaro-Blanco J, Otero A.** 2018a. High prevalence of quorum-sensing and quorum-quenching activity among cultivable bacteria and metagenomic sequences in the Mediterranean Sea. *Genes (Basel)*. **9**(2). pii: E100. doi: 10.3390/genes9020100.
- Muras A, Mayer C, Romero M, Camino T, Ferrer MD, Mira A, Otero A.** 2018b. Inhibition of *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation by extracts of *Tenacibaculum* sp. 20J, a bacterium with wide-spectrum quorum quenching activity. *J Oral Microbiol*. **10**(1): 1429788. doi: 10.1080/20002297.2018.1429788.
- Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR.** 2003. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **47**:582-587.
- Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, Actis LA.** 2010. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol*. **192**:6336-6345. doi: 10.1128/JB.00917-10.

- Nait Chabane Y, Marti S, Rihouey C, Alexandre S, Hardouin J, Lesouhaitier O, Vila J, Kaplan JB, Jouenne T, Dé E.** 2014a. Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. PLoS One. 9(10):e111660. doi: 10.1371/journal.pone.0111660.
- Nait Chabane Y, Mlouka MB, Alexandre S, Nicol M, Marti S, Pestel-Caron M, Vila J, Jouenne T, Dé E.** 2014b. Virstatin inhibits biofilm formation and motility of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol. 14:62. doi: 10.1186/1471-2180-14-62.
- Narayanan A, Nair MS, Kaurmathis DP, Baskaran SA, Venkitanarayanan K, Amalaradjou MA.** 2016. Inactivation of *Acinetobacter baumannii* biofilms on polystyrene, stainless steel, and urinary catheters by octenidine dihydrochloride. Front Microbiol. 7:847. doi: 10.3389/fmicb.2016.00847.
- Nealson KH, Hastings JW.** 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol Rev. 43:496-518.
- Nealson KH.** 1977. Autoinduction of bacterial luciferase: occurrence, mechanism and significance. Arch Microbiol. 112:73-79.
- Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L.** 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 162:393-404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006.
- Nicol M, Alexandre S, Luizet JB, Skogman M, Jouenne T, Salcedo SP, Dé E.** 2018. Unsaturated fatty acids affect quorum sensing communication system and inhibit motility and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*. Int J Mol Sci. 19(1). pii: E214. doi: 10.3390/ijms19010214.
- Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN.** 2008. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol. 190:3386-3392. doi: 10.1128/JB.01929-07.
- Noori E, Rasooli I, Owlia P, Mousavi Gargari SL, Ebrahimizadeh W.** 2014. A conserved region from biofilm associated protein as a biomarker for detection of *Acinetobacter baumannii*. Microb Pathog. 77:84-88. doi: 10.1016/j.micpath.2014.11.004.
- Nwugo CC, Arivett BA, Zimble DL, Gaddy JA, Richards AM, Actis LA.** 2012. Effect of ethanol on differential protein production and expression of potential virulence functions in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 7(12):e51936. doi: 10.1371/journal.pone.0051936.

- Ochiai S, Morohoshi T, Kurabeishi A, Shinozaki M, Fujita H, Sawada I, Ikeda T.** 2013. Production and degradation of *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules in bacteria isolated from activated sludge. *Biosci Biotechnol Biochem.* **77**:2436-2340.
- Ochiai S, Yasumoto S, Morohoshi T, Ikeda T.** 2014. AmiE, a novel *N*-acylhomoserine lactone acylase belonging to the amidase family, from the activated-sludge isolate *Acinetobacter* sp. strain Ooi24. *App Environ Microbiol.* **80**:6919-6925. doi: 10.1128/AEM.02190-14.
- Oh MH, Choi CH.** 2015. Role of LuxIR homologue AnoIR in *Acinetobacter nosocomialis* and the effect of viristatin on the expression of *anoR* gene. *J Microbiol Biotechnol.* **25**:1390-1400. doi: 10.4014/jmb.1504.04069.
- 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.
- Orsinger-Jacobsen SJ, Patel SS, Vellozzi EM, Gialanella P, Nimrichter L, Miranda K, Martinez LR.** 2013. Use of a stainless steel washer platform to study *Acinetobacter baumannii* adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces. *Microbiol.* **159**:2594-2604. doi: 10.1099/mic.0.06 8825-0.
- Palmen R, Hellingwerf KJ.** 1995. *Acinetobacter calcoaceticus* liberates chromosomal DNA during induction of competence by cell lysis. *Curr Microbiol.* **30**:7-10.
- Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F.** 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the maintechniques currently in use. *Ann Ig.* **25**:31-42. doi: 10.7416/ai.2013.1904.
- 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.
- Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY, Lee JK.** 2003. AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology.* **149**:1541-1550.
- Park YK, Ko KS.** 2015. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. *J Microbiol.* **53**:53-59. doi: 10.1007/s12275-015-4498-5.
- Peleg AY, de Breij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, Nibbering PH, Earl AM, Ward DV, Paterson DL, Seifert H, Dijkshoorn L.** 2012. The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One.* **7**(10):e46984. doi: 10.1371/journal.pone.0046984.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* **21**:538-582. doi: 10.1128/CMR.00058-07.

- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA.** 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**:3471-84.
- Phillips DL, MacMahon JA.** 1981. Competition and spacing patterns in desert shrubs. *J Ecol.* **69**:97–115. <http://dx.doi.org/10.2307/2259818>.
- Piechaud M, Second L.** 1951. Studies of 26 strains of *Moraxella Iwoffii*. *Ann Inst Pasteur.* **80**:97-99.
- Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjarde SS, Chopade BA.** 2011. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **62**:328-338. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00818.x.
- Prakasam G, Anusha R, Ramesh SS.** 2013. Rhamnolipid production among clinical and skin isolates of healthy individuals of *Acinetobacter* species: The first report. *Int J Appl Basic Med Res.* **3**:133. doi: 10.4103/2229-516X.117103.
- Prashanth K, Vasanth T, Saranathan R, Makki AR, Pagal S.** 2012. Antibiotic resistance, biofilms and quorum sensing in *Acinetobacter* species. In: Pana M, editor. *Antibiot Resist Bact – A Contin Chall New Millenn. InTech.* pp. 180–212.
- Qazi S, Middleton B, Muharram SH, Cockayne A, Hill P, O’Shea P, Chhabra SR, Cámara M, Williams P.** 2006. *N*-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect.Immun.* **74**:910–919.
- Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K.** 2008. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* **26**:333–337.
- Rasch M, Buch C, Austin B, Slierendrecht WJ, Ekmann SK, Larsen JL, 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 (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum). *System Appl Microbiol.* **27**:350-359.
- Reffuveille F, de la Fuente-Núñez C, Mansour S, Hancock RE.** 2014. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**:5363-5371. doi: 10.1128/AAC.03163-14.
- Remuzgo-Martínez S, Lázaro-Díez M, Mayer C, Aranzamendi-Zaldumbide M, Padilla D, Calvo J, Marco F, Martínez-Martínez L, Icardo JM, Otero A, Ramos-Vivas J.** 2015. Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol.* **81**:3306-3315. doi: 10.1128/AEM.00088-15.
- 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 LB. 2006. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. **43**:S100–S105. <http://dx.doi.org/10.1086/504487>.

Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. **197**:1079-1081. doi: 10.1086/533452.

Richmond GE, Evans LP, Anderson MJ, Wand ME, Bonney LC, Ivens A, Chua KL, Webber MA, Sutton JM, Peterson ML, Piddock LJ. 2016. The *Acinetobacter baumannii* two-component system AdeRS regulates genes required for multidrug efflux, biofilm formation, and virulence in a strain-specific manner. MBio. **7**(2):e00430-16. doi: 10.1128/mBio.00430-16.

Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol. **3**:148. doi: 10.3389/fmicb.2012.00148.

Romero M, Martin-Cuadrado AB, Roca-Rivada A, Cabello AM, Otero A. 2011a. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. FEMS Microbiol Ecol. **75**:205-217. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01011.x.

Romero M, Avendaño-Herrera R, Magariños B, Cámara M, Otero A. 2010. Acyl homoserine 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. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01889.x.

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. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01046.x.

Romero M. 2010. Interceptación de señales de comunicación bacteriana tipo *N*-acilhomoserín lactona (AHL) en bacterias marinas aisladas del medio marino. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.

Romero M, Muro-Pastor AM, Otero A. 2011b. Quorum sensing *N*-acyl-homoserine lactone signals affect nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. FEMS Microbiol Lett. **315**:101-108. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02175.x.

Romero M, Martin-Cuadrado AB, Otero A. 2012. Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences. Appl Environ Microbiol. **78**:6345-6358. doi: 10.1128/AEM.01266-12.

Romero M, Muras A, Mayer C, Buján N, Magariños B, Otero A. 2014. In vitro quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. Dis Aquat Org. **108**:217–225. doi: 10.3354/dao02697.

Romero M, Mayer C, Muras A, Otero A. 2015. Silencing bacterial communication through enzymatic quorum sensing inhibition. In: Quorum sensing vs Quorum Quenching: a battle with no end in sight. Kalia V. eds. Springer. pp. 219-236. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8_19.

Ron EZ, Rosenberg E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol.* **3**:229-36.

Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, Rodríguez-Ezpeleta N, Fullaondo A, Valle J, Tomás M, Bou G, Poza M. 2013. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLoS One.* **8**(8):e72968. doi: 10.1371/journal.pone.0072968.

Rumbo-Feal S, Pérez A, Ramelot TA, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, Ohneck EJ, Arivett BA, Merino M, Fiester SE, Kennedy MA, Actis LA, Bou G, Poza M. 2017. Contribution of the *A. baumannii* A1S_0114 gene to the interaction with eukaryotic cells and virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* **7**:108. doi: 10.3389/fcimb.2017.00108.

Rutherford ST, Bassler BL. 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**(11). pii: a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427.

Sahu PK, Iyer PS, Barage SH, Sonawane KD, Chopade BA. 2014. Characterization of the multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* AIIMS 7 and correlation with biofilm development on abiotic surface. *ScientificWorldJournal.* 593546. doi: 10.1155/2014/593546.

Sahu PK, Iyer PS, Oak AM, Pardesi KR, Chopade BA. 2012. Characterization of eDNA from the clinical strain *Acinetobacter baumannii* AIIMS 7 and its role in biofilm formation. *ScientificWorldJournal.* 973436. doi: 10.1100/2012/973436.

Sambanthamoorthy K, Luo C, Pattabiraman N, Feng X, Koestler B, Waters CM, Palys TJ. 2014. Identification of small molecules inhibiting diguanylate cyclases to control bacterial biofilm development. *PLoS One.* **9**:1-10. doi: 10.1080/08927014.2013.832224.

Sambanthamoorthy K, Hickman M, Pattabiraman N, Palys T, Wagar EJ. 2015. Modulating *Acinetobacter baumannii* biofilm development with molecules containing 3,4,5-trimethoxy-*N,N,N'*-trimethylbenzohydrazide moiety. *Bioorg Med Chem Lett.* **25**:2238-2242. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.03.005.

Sarkar S, Chakraborty R. 2007. Quorum sensing in metal tolerance of *Acinetobacter junii* BB1A is associated with biofilm production. *FEMS Microbiol Lett.* **282**:160-165. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01080.x.

Saroj SD, Rather PN. 2013. Streptomycin inhibits quorum sensing in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**:1926-1929. doi: 10.1128/AAC.02161-12.

Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.* **4**:47. doi: 10.3389/fmicb.2013.00047.

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 *Gloethece* PCC6909. *ISME J.* **2**:1171-1182. doi: 10.1038/ismej.2008.68.

Shikuma NJ, Yildiz FH. 2009. Identification and characterization of OseR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* **191**:4082-4096. doi: 10.1128/JB.01540-08.

Shipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, Quitschau M, Grond S, Streit WR. 2009. Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microb.* **75**:224-233. doi: 10.1128/AEM.01389-08.

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.

Siryaporn A, Kuchma SL, O'Toole GA, Gitai Z. 2014. Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA.* **111**:16860-16865. doi: 10.1073/pnas.1415712111.

Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, Hammer B, Zimmermann O, Ziesing S, Wichelhaus TA, Hunfeld KP, Borgmann S, Gröbner S, Higgins PG, Seifert H, Busse HJ, Witte W, Pfeifer Y, Wilharm G. 2012. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int J Med Microbiol.* **302**:117-128. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.03.003.

Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, Snyder M. 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* **21**:601-614.

Soares NC, Spät P, Méndez JA, Nakedi K, Aranda J, Bou G. 2014. Ser/Thr/Tyr phosphoproteome characterization of *Acinetobacter baumannii*: comparison between a reference strain and a highly invasive multidrug-resistant clinical isolate. *J Proteomics.* **102**:113-124. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.009.

- Sousa C, Silva L, Grosso F, Nemeč A, Lopes J, Peixe L.** 2014. Discrimination of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species by Fourier transform infrared spectroscopy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **33**:1345-1353. doi: 10.1007/s10096-014-2078-y.
- Stacy DM, Le Quement ST, Hansen CL, Clausen JW, Toker-Nielsen T, Brummond JW, Givskov M, Nielsen TE, Blackwell HE.** 2013. Synthesis and biological evaluation of triazole-containing *N*-acyl homoserine lactones as quorum sensing modulators. *Org Biomol Chem.* **11**:938-954. doi: 10.1039/c2ob27155a.
- Stacy DM, Welsh MA, Rather PN, Blackwell HE.** 2012. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native *N*-acyl homoserine lactones. *ACS Chem Biol.* **7**:1719-1728. doi: 10.1021/cb300351x
- Steinberger RE, Holden PA.** 2005. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **71**:5404-5410.
- Stevens AM, Greenberg EP.** 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol.* **179**:557-562.
- Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onodera S, Hori S, Mizunoe Y.** 2018. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep.* **8**:2254. doi: 10.1038/s41598-018-20485-z.
- 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.
- Taga ME, Bassler BL.** 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**:14549-14554. doi: 10.1073/pnas.1934514100.
- 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. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01904.x.
- Tamura K, Kumar S, Nei M, Dudley J.** 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* **9**:299-306. doi: 10.1093/bib/bbn017.
- Thompson RJ, Bobay BG, Stowe SD, Olson AL, Peng L, Su Z, Actis LA, Melander C, Cavanagh J.** 2012. Identification of BfmR, a response regulator involved in biofilm development, as a target for a 2-aminoimidazole-based antibiofilm agent. *Biochemistry.* **51**:9776-9778. doi: 10.1021/bi3015289.
- Tipton KA, Dimitrova D, Rather PN.** 2015. Phase-variable control of multiple phenotypes in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol.* **197**:2593-2599. doi: 10.1128/JB.00188-15.

Tjernberg I, Ursing J. 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS*. **97**:595-605.

Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiol*. **149**:3473-3484.

Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. 2008. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiol*. **154**:3398-3409. doi: 10.1099/mic.0.2008/019471-0.

Tomasz A, Hotchkiss RD. 1964. Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc Natl Acad Sci USA*. **51**:480-487.

Torres M, Romero M, Prado S, Dubert J, Tahrioui A, Otero A, Llamas I. 2013. *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve cultures. *Microbiol Res*. **168**:547-554. doi: 10.1016/j.micres.2013.04.011.

Towner KJ. 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* **73**:355–363. doi: 10.1016/j.jhin.2009.03.032.

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.

Uroz S, Oger P, Chhabra SR, 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.

Uroz S, Oger PM, Chapelle E, Adeline MT, 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. doi: 10.1128/AEM.02014-07.

Uroz S, Dessaux Y, Oger P. 2009. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem*. **10**:205-216. doi: 10.1002/cbic.200800521.

Val DL, Cronan JE Jr. 1998. In vivo evidence that *S*-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J Bacteriol*. **180**:2644-2651.

Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernández-Cuenca F, Garnacho-Montero J, Cisneros JM, Ortíz C, Pachón J, Aznar J. 2009. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **30**:257-263. doi: 10.1086/595977.

Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie JM, Raoult D, Médigue C, Weissenbach J, Cruveiller S. 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One*. 3(3):e1805. doi: 10.1371/journal.pone.0001805.

Vandeveldt NM, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2014. Antibiotic activity against naive and induced *Streptococcus pneumoniae* biofilms in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 58:1348-1358. doi: 10.1128/AAC.01858-13.

Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, Bello H, Gonzalez G, Garcia A, Zemelman R. 1996. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios*. 86:49-58.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 59:1210-1215.
vs quorum quenching: a battle with no end in sight.

Walzer G, Rosenberg E, Ron EZ. 2006. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. *Environ Microbiol*. 8:1026-1032.

Wang LH, Weng LX, Dong YH, Zhang LH. 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone lactonase (AHL lactonase). *J Biol Chem*. 279:13645-13651.

Wang S, Parsek MR, Wozniak DJ, Ma LZ. 2013. A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*. 15:2238-2253. doi: 10.1111/1462-2920.12095.

Wang WZ, Morohoshi T, Ikenoya M, Somaya N, Ikeda T. 2010. AiiM, a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microbiol*. 76:2524-2530. doi: 10.1128/AEM.02738-09.

Wang WZ, Morohoshi T, Someya N, Ikeda T. 2012. AidC, a novel *N*-acylhomoserine lactonase from the potato root-associated *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) group bacterium *Chryseobacterium* sp. strain StRB126. 78:7985-7992. doi: 10.1128/AEM.02188-12.

Wang Y, Bao W, Guo N, Chen H, Cheng W, Jin K, Shen F, Xu J, Zhang Q, Wang C, An Y, Zhang K, Wang F, Yu L. 2014. Antimicrobial activity of the imipenem/rifampicin combination against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* grown in planktonic and biofilm cultures. *World J Microbiol Biotechnol*. 30:3015-3025. doi: 10.1007/s11274-014-1728-7.

Waters CM, Bassler BL. 2005. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:319-346.

Whitchurch CB, Leech AJ, Young MD, Kennedy D, Sargent JL, Bertrand JJ, Semmler AB, Mellick AS, Martin PR, Alm RA, Hobbs M, Beatson SA, Huang B, Nguyen L, Commolli JC, Engel JN, Darzins A, Mattick JS. 2004.

Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **52**:873-893.

Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* **295**:1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487

Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **25**:365-404. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89

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.

Winans SC, Bassler BL. 2002. Mob Psychology. *J Bacteriol.* **184**:873-883.

Xing L, Barnie PA, Su Z, Xu H. 2014. Development of efflux pumps and inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. *Clin Microbiol.* **3**:135. doi: 10.4172/2327-5073.1000135

Yang L, Wang LH, Wang J, Dong YH, Hu JY, Zhang LH. 2005. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett.* **579**:3713-3717.

Yang L, Haagenen JA, Jelsbak L, Johansen HK, Sternberg C, Høiby N, Molin S. 2007. In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J Bacteriol.* **190**:2767-2676. doi: 10.1128/JB.01581-07.

Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, 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.

Yeon KM, Cheong WS, Oh HS, Lee WN, Hwang BK, Lee CH, Beyenal H, Lewandowski Z. 2009. Quorum sensing: A new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment. *Environ Sci Technol.* **43**:380-385.

Yoon EJ, Chabane YN, Goussard S, Snesrud E, Courvalin P, Dé E, Grillot-Courvalin C. 2015. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *6*(2). pii: e00309-15. doi: 10.1128/mBio.00309-15.

Yoshida S, Tazaki K, Minamikawa T. 1975. Occurrence of shikimic and quinic acids in angiosperms. *Phytochemistry.* **14**:195–197.

Zhang HB, Wang C, Zhang LH. 2004. The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol Microbiol.* **52**:1389-13401.

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.

Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. 2007. Detection and analysis of quorum-quenching enzymes against acyl homoserine lactone quorum-sensing signals. *Curr Protoc Microbiol.* **1**:1C.3. doi: 10.1002/9780471729259.mc01c03s05.

Zhang HZ, Zhang JS, Qiao L. 2013. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. *World J Emerg Med.* **4**:169-174. doi: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2013.03.002.

Zhang Y, Brackman G, Coenye T. 2017. Pitfalls associated with evaluating enzymatic quorum quenching activity: the case of MomL and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* biofilms. *PeerJ.* **5**:e3251. doi: 10.7717/peerj.3251.

Zhu H, Thuruthyl SJ, Willcox MD. 2001. Production of *N*-acyl homoserine lactones by gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clin Exp Ophthalmol.* **29**:150-152.







ANEXOS



ANEXO I. Secuencias de lactonasas

A1S_0383 (*Acinetobacter baumannii* ATCC17978)

Secuencia del gen (codones de inicio y terminación en negrita)

ATGCTGCAAGTCAAAAATTGTTCCAGTTACTGCTTTTGGCTCAAAAATTGTTCTTTAGTTTGGGACAGTGAAA
 CAAAAGAAGCAGTTTTTGATTGATGCAGGCGGTGATGCTGCTGTTTTGAAGAAAGAAGTAGAAGCCTTAGG
 TTTAAAAGTAAAGGCGTTATGGCTTACTCATGGGCATTTAGATCACGCTGGGGCTGTAGGTGAACTCGCA
 AAAGAGTGGAGTGTTCCTGTTGTTGGTCCGCATAAAAGAAGATCAGTTCCTGGCTAGATATGATTCAGGAAG
 TTTCCGCACGTTATGGTTTTCCAATCCCACAGCCTGTAAAAGTCGATCAATGGCTTGAAGGCGGTGAAGT
 GCTAAAACCTGGGTGAAGATGAGTTTGGGTTGAGGTACGTTTTGCACCAGGACATACACCAGGTCACGTCATGTT
 TATAACAAGAACATCATGGTTTTACTCTGGACTGGCGATGTCTGTTTTAAAGGCTCAATTGGAAGAACAGATT
 TTCCACGTGGTAATCATGAGCAACTGATTGAATCAATTCAGCGTGAGTGTTTTAGCTTACCAGATGAAAC
 CCAGTTTTATTCTGGACATGGGCCAATGAGTACCATTGGCTATGAAAAACAATTTAACCCGTTTGTGCGCA
 GGTAAGCGGGT**TAA**

Secuencia de aminoácidos

MLQVKIVPVTAFAQNCSLVWDSETKEAVLIDAGDAAVLKKEVEALGLKVKALWLTHGHLDHAGAVGELA
 KEWSVPVVGPHKEDQFWLDMIQEVSARYGFPIQPVKVDQWLEGGEVLKLGEDFEVRFAPGHTPGHVMF
 YKNHGLLWTDVLFKGSIGRTDFPRGNHEQLIESIQRECFSLPDETQFISGHGPMSTIGYEKQFNPFVA
 GKAG

A1S_1876 (*Acinetobacter baumannii* ATCC17978)

Secuencia del gen (codones de inicio y terminación en negrita)

ATGCAACAACCTCTAGTAAAAGATTTTTTGGATGAAAAATACCAATACTTTTAGCTATGTTGTTGCGGATT
 TAGCAACCCGTCATGTGCAATTATTGATAGTGTGCTTGACTATGATGCTGCTTCGGCCACTACAAAAAC
 AACTAATGCTGATCTGATCGTTCGATTATGTCTTGGCGCAAAACTTTAAAGTACAATGGATTTTAGAAACC
 CATGTACATGCGGACCATATGACTGCGGCTCAATATTTAAAATCTAAATTGGGCGGTACAATTGCGATTA
 GTCAAAAAATCTCGGTAGTACAAGAAACATTTTCGGCTATTTATAATTTTGATTTTAAGAAATTCATGA
 AAATCAGCCTTTTGATTATCTATTTGAAGATTATGAACATTTCAAAATAGGGGAAATAGATGCCTATAAC
 ATTCTACACCAGGGCATAACCTGCTTGTCTTAAGCTATGTGATTGGTGTGCTGTTTTTGTGCGGGGATA
 CTTTATTTATGCCCGATTATGGTTCGGCCAGATGCGATTTTCCATAAGGAAGTGTGCTGCCTTTATGA
 TTCGGTACAAAAGCTTTATACACTTCTGACGATATGCGTATGTTTCTATGCCATGATTATAAGCCCGAA
 GGCCGTGACGAATATATCTGTCAAACAGATATAAAAACCAAAAACAAAGCAATATCCATTTAAATCGAC
 GAGTTTCCAAAAGAAATCATTCAATAAAAATGCGTCAAGAAAGAGATGCTACTTTGGCAATGCCAAAATTAAT
 TCTGCCTTCAATTCAAATTAATATGAACGGTGGAAAATTTCCGGAACCTGAAGCGAATGGCATCCGCTAT
 TAAAAAATCCCATTTAATTACTTT**TAG**

Secuencia de aminoácidos

MQQPLVKDFDFDENTNTFSYVVADLATRQCAIIDSVDLYDAASATTKTTNADLIVDYVLAQNFKVQWILET
 HVHADHMTAAQYLKSKLGGTIAISQKISVQVETFSAIYNFDFKKNENQPFDYLFEDYEHFKIGEIDAYN
 IPTPGHTPACLSYVIGDAVFGDTLFPDYGSARCDFPKGSAAALYDSVQKLYTLPDDMRMFLCHDYKPE
 GRDEYICQTDIKTQKQSNIHNLNRRVSKESFIKMRQERDATALMPKLIILPSIQINMNGGNFPEPEANGIRY
 LKIPFNYP

A1S_2662 (*Acinetobacter baumannii* ATCC17978)

Secuencia del gen (codones de inicio y terminación en negrita)

ATGAAAAAACTATTTGTAGCCTTAGGACTTATCATGGGTAGCTTGCATATAAGCTATGCAGAACCAGCTT
 CAGCTCAACAAGTACCAGGATATTACCATCATCAATTCGGTAATTATCGGATAACTTCCTTGCTCGATGG
 CACTATTTATCTAGATCCTAAATGTTTTAAAAATTTAAGTCAGGCTGAAAAAATAAAATTTTAACGAAA
 TATGCTGCTGTAATGAGAAGGGGATTCAGACTTCAGTAAATGCCTTTTTGGTTGATGATGGTAAAAGTT
 TGACGCTTGTGACAGTGGAGCTGCGAGTTGTTTTGGTCCACAGTTAGGTTCAATTGCTAAAAATCTTGA
 ATTAGCGGGCTATCAACTTGCCAATGTGAAAACGTTTTTATTGACCCACTTACATCCAGACCATGTGTGC
 GGTATTGCTCAAAAATGAAAAAGCCGATTTCCATAATGCAACGATCTATGCTCATGAACGTGAAGCAGATT
 ATTGGTTAAAATCCAGCAAAATGAAAAACTGTACCAGCGGATAAAAAAGAAAAATTTTAGGTACTGTTAA
 AAATGTAAAAGCTGCACCTTATCAAGCAAAAAAGCATTCAAAAACCTTTAAAGATGGTGATGTT
 ATTCAAGGTTTTGAAGTGATCAATACACAAGGGCACACACCGGGACACCATAGCTTCCGTTTGAAGAGTA
 AAGGGCAACAAAATGTCTTTGTTGGTGATATTGTCCACTCACATTTTACAGTTTGTGCTCCAAAAAC
 TGGGGTAGATTTTGTGATAAATTCAGAGCAGGCAATTAATACTCGTTTTAAAAATGTTTGTGCTGAAATTTCA

AATAAGCAACAATGGGTAGCTGCCCCGATTTACCGTTCCCAGGAATTGGTCATGTGTATAAAGTGAATG
CTGAGCAGTATCAGTGGATTCCCTTATATTTTAATAACAGTCTTGATAAA**TAA**

Secuencia de aminoácidos

MKKLFVALGLIMGSLHISYAEPASAQVPGYYHHQFGNYRITSLLDGTIYLDPKLKFKNLSQAECTKILTK
YAAVNEKGIQTSVNAFLVDDGKSLTLVDSGAASCFCGPQLGSIKNELELAGYQLANVKTVLLTHLHPDHVC
GIAQNGKAVFPNATIYAHEREADYWLNPANEKTVPADKKENYLGTVKNVKAALAPYQAKKAFKTFKDGDV
IQGFVINTQGHTPGHHSFRLKSKGQQIVFVGDIVHSHSLQFDAPKTGVDFDVNSEQAINTRLKMFAEIS
NKQQWVAAPHLPPFGIGHVYKVNAEQYQWIPLYFNNSLDK

Aida (*Acinetobacter baumannii* ATCC17978)

Secuencia del gen (codones de inicio y terminación en negrita)

ATGGGTAAAAGTCTAAATAATGTGCCCCAAGCACCCTAGATGTTTCAGTTTAAATTCAAATGGCATGAAAT
GCAGCGCTATTTATATCGTCCAGCCACCGAGGTAGCTACTCCAATGATTGTGATGGCGCACGGTCTGGG
TGGTACTCGTAGAATGCGTTTAAACAGCTTTTGCAGAGCGCTTTGTGGCAGAGGGTTATGCTTGTTTAGTG
TTTGATTATCGCTATTTTGGTGATAGCGAAGGACAACCTCGACAATTACTAGATATAAAAAGTCAGCTCG
AAGACTGGAAAGCTGCCATTGCCTATGCACGTAGCCTAGACAAAATGACCCAAACCGCGTAGTTATATG
GGAACTTCTTTGGTGGAGGCCATGTGCTGGCAACAGCTGCTGATGATAATCGACTTGCTGCTGTTATA
TCACAATGCCCCCTCACTGATGGTTTCTCATCTAGCATGGCAATGGACCCGATAACGACCTCAAGCTCA
CGGGACTCGCTTTAAAAGACAAGATTGGATCAATGCTCAGCGCCAAGCCAGTCATGGTGCCACTTGCAGC
GCCATCAGGACATACAGCATTAATGAATGCACCTGACGCTTATTCAGGCTATCTCGCACTCATGCCTTCA
GGTTCAAATATTCCAAACTATGTCGCTGCACGTTTGTACTCGACATCATACGCTATTACCCGGGCCGTA
AGACATCCCGTATTCAAGCCCCGTGCTATTTTGTGTCTGTGATACCGACTCGGTGGCCCCCTCAAAAAC
AACATTGCGTCATGCGAGCCATACACCCAATCATGAAATTAAGCACTACGCCGATGGTCATTTTGAATTT
TACGTTGGAGAAGCTTTTGGAGCGTGTGTTTCGTGATCAGATCGACTTCTTAAACGCATCGTTCAGTCA
AG**TAA**

Secuencia de aminoácidos

MGKSLNNVPQAPLDVQFNSNGMKCSAYLYRPATEVATPMIVMAHGLGGTRRMRLTAFERFVAEGYACLV
FDYRYFGDSEGQPRQLLDIKSQLEDWKAAYARSLDKIDPNRVVIWGTSFGGGHVLATAADDNRLAIVI
SQCPFTDGFSSSMAMPITTLKLTGLALKDKIGSMLSAPVMVPLAAPSGHTALMNAPDAYSGYLALMPS
GSNIPNYVAARFVLDIIRYYPGRKTSRIQAPVLFVCDTDSVAPSKTTLRHASHTPNHEIKHYADGHFEI
YVGEAFERVVVDQIDFLKRIVPVK

RESEARCH ARTICLE

Quorum sensing network in clinical strains of *A. baumannii*: AidA is a new quorum quenching enzyme

María López^{1,2}, Celia Mayer³, Laura Fernández-García¹, Lucía Blasco¹, Andrea Muras³, Federico Martín Ruiz⁴, German Bou^{1,2}, Ana Otero³, María Tomás^{1,2*}, on behalf of the GEIH-GEMARA (SEIMC)[†]

1 Department of Microbiology, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC)-INIBIC, A Coruña, Spain, **2** Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), Virgen Macarena, Seville, Spain, **3** Department of Microbiology, Faculty of Biology-CIBUS, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, **4** Biological Research Center (CIB-CSIC), Madrid, Spain

[†] Membership of the GEIH-GEMARA (SEIMC) is provided in the Acknowledgments.

* MA.del.Mar.Tomas.Carmona@sergas.es



OPEN ACCESS

Citation: López M, Mayer C, Fernández-García L, Blasco L, Muras A, Ruiz FM, et al. (2017) Quorum sensing network in clinical strains of *A. baumannii*. AidA is a new quorum quenching enzyme. PLoS ONE 12(3): e0174454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454>

Editor: Feng Gao, Tianjin University, CHINA

Received: November 25, 2016

Accepted: March 9, 2017

Published: March 22, 2017

Copyright: © 2017 López et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by grant PI13/02390 awarded to MT within the State Plan for R +D+I 2013-2016 (National Plan for Scientific Research, Technological Development and Innovation 2008-2011) and co-financed by the ISCIII-Deputy General Directorate of evaluation and Promotion of Research - European Regional Development Fund "A way of Making Europe" and Instituto de Salud Carlos III FEDER, Spanish

Abstract

Acinetobacter baumannii is an important pathogen that causes nosocomial infections generally associated with high mortality and morbidity in Intensive Care Units (ICUs). Currently, little is known about the Quorum Sensing (QS)/Quorum Quenching (QQ) systems of this pathogen. We analyzed these mechanisms in seven clinical isolates of *A. baumannii*. Microarray analysis of one of these clinical isolates, Ab1 (*A. baumannii* ST-2_clon_2010), previously cultured in the presence of 3-oxo-C12-HSL (a QS signalling molecule) revealed a putative QQ enzyme (α/β hydrolase gene, AidA). This QQ enzyme was present in all non-motile clinical isolates (67% of which were isolated from the respiratory tract) cultured in nutrient depleted LB medium. Interestingly, this gene was not located in the genome of the only motile clinical strain growing in this medium (*A. baumannii* strain Ab421_GEIH-2010 [Ab7], isolated from a blood sample). The AidA protein expressed in *E. coli* showed QQ activity. Finally, we observed downregulation of the AidA protein (QQ system attenuation) in the presence of H₂O₂ (ROS stress). In conclusion, most of the *A. baumannii* clinical strains were not surface motile (84%) and were of respiratory origin (67%). Only the *pilT* gene was involved in surface motility and related to the QS system. Finally, a new QQ enzyme (α/β hydrolase gene, AidA protein) was detected in these strains.

Introduction

Quorum Sensing (QS) is a general mechanism used by Gram-negative bacteria to regulate many biological processes, including virulence, competence, conjugation, resistance, motility and biofilm formation [1]. The production and detection of bacterial cell-cell signalling molecules by various species have been linked to the enhanced development of single and multi-species biofilms [2]. A variety of structurally different bacterial cell-cell signalling molecules have been shown to mediate cell-cell communication, including acyl homoserine lactones

Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). M. Tomás was financially supported by the Miguel Servet Research Programme (C.H.U.A Coruña and ISCIII). A. Muras was financially supported by a predoctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Plan I2C). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

(AHLs) and autoinducer-2 molecules (AI-2). AHLs have been proposed to mediate intra-species bacterial communication; different species typically only recognize AHLs produced from closely related species [3]. On the other hand, AI-2 has been shown to mediate inter-species signalling [4]. The term AI-2 describes a family of inter-convertible molecules derived from the precursor molecule (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD) [5]. This precursor molecule is produced or detected by many Gram-positive and Gram-negative bacteria [6].

The QS system in *Acinetobacter* sp. has been described as homologous to the LuxR receptor (AbaR) and LuxI synthase (AbaI) proteins in *Vibrio fischeri* [7, 8]. Acyl homoserine lactones (AHLs) are classified on the basis of the length of the acyl chain as short- or long-chain molecules. Many strains of *Acinetobacter* (63%) produce more than one AHL ($\geq C_{10}$). Moreover, none of the AHL signals can be specifically assigned to any particular species of this genus [9]. In this pathogen, AHL molecules are autoinducers of the QS system involved in motility and biofilm production [10]. Secretion of quorum signals has been associated with multidrug efflux pumps [11, 12]. The AdeFGH efflux pump has recently been related to the synthesis and transport of autoinducers during biofilm formation regulated by the QS system in clinical strains [12]. Overexpression of the AdeABC efflux pump by deletion of the two-component regulatory system, AdeRS, has also been associated with biofilm formation and virulence phenotype in this pathogen [13]. However, little is known about the cascade of genes associated with various mechanisms controlled by the QS system in nosocomial pathogens such as *A. baumannii*. In an earlier study of the genes involved in QS activation in *A. baumannii* ATCC 17978, Clemmer *et al.* observed overexpression of an operon comprising the *AIS_0112* to *AIS_0118* genes [10].

The Quorum Quenching (QQ) mechanism can effectively interfere with any one of the key processes in QS, and this could potentially be exploited to quench QS and prevent microbial infections (inhibition of motility and biofilm formation) [14]. Naturally occurring QQ mechanisms act by blocking the key steps of QS, such as signal generation, signal accumulation and signal reception. Microorganisms exist in a multi-species, competitive environment and have developed many survival strategies to gain benefits and compete for space, nutrition and ecological niches. One of these, QS interruption, is straightforward because bacteria that produce QQ agents can inhibit the QS-regulated behaviour of competing species and therefore obtain benefits or avoid being killed. An AHL acylase, AmiE, has recently been identified in *Acinetobacter* sp. strain Ooi24 [15, 16]. However, this QQ mechanism is not well known in clinical isolates of *A. baumannii*.

In 2016, Vijayakumar *et al.* analyzed the nature of the clinical isolates of *A. baumannii* in relation to biofilm formation and motility [17]. These authors concluded that the least motile strains were those obtained from respiratory samples (the main origin of isolates of this pathogen). Interestingly, 67% of the non-motile clinical isolates in this study were of a respiratory nature. The oxygen-rich environment generates reactive oxygen species (ROS) (e.g. superoxide anion $[O_2^-]$ and hydrogen peroxide $[H_2O_2]$), which can dramatically increase damage to cell structures in a process known as oxidative stress. To reduce the potential damage caused by these reactive intermediates, the bacteria possess ROS detoxifying enzymes (SOD and catalase proteins) [18]. Recent studies have suggested that the response to ROS is controlled by the QS system in *A. baumannii* [19, 20]. In all aerobically-grown microorganisms, the stress induced by ROS such as the superoxide anion radical (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) causes macromolecular damage [21].

In this study, we used microbiological and transcriptomic assays (microarrays and RT-PCR) to analyze the Quorum Sensing/Quenching systems in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* in relation to surface motility. We also studied the involvement of these systems (QS/QQ) in the oxidative stress mechanism (ROS system).

Material and methods

Strains and susceptibility

Seven clinical strains shown by multilocus sequence typing (MLST) to have different allelic profiles or sequence types (STs) and different susceptibility to several antimicrobials were used in this study (Table 1). The mechanisms of resistance to several antimicrobials are shown in Table 2. The genomes of two isolates used in the study have already been sequenced: *Acinetobacter baumannii* ST-2_clon_2010 (Genbank acc.num. LJHB00000000) [22] and *Acinetobacter baumannii* strain Ab421_GEIH-2010 (Genbank acc.num CP014266) [23], Ab1 and Ab7 respectively. Both whole genome sequencing studies (WGS) are part of the GEIH-REIPI Spanish Multicenter *Acinetobacter baumannii* Study II 2000–2010, project PRJNA308422. The *abaR* and *abaI* genes were also sequenced in the present study.

Effect of culture conditions and quorum sensing inhibitors on motility

In view of the different responses shown by *A. baumannii* and *A. nosocomialis* to culture medium and Quorum Sensing inhibitors (Mayer *et al.*, 2016, submitted), motility assays were performed in plates containing either Luria–Bertani (Normal LB) medium or modified LB-LN (nutrient depleted) [10]. The Normal LB medium contained (per litre) 10 g tryptone, 5 g yeast extract and 10 g NaCl per litre, while the modified LB contained 2 g tryptone, 1 g yeast extract and 5 g NaCl. Assays were carried out with 0.25% of Difco (Bacto™ agar). Motility studies were carried out in the presence of QQ lactonase Aii20J enzyme, furanones and exogenous N-acyl homoserine lactone molecule (3-oxo-C12-HSL 10 uM).

The strains were inoculated in both normal LB and modified LB broth and incubated overnight at 37°C. An aliquot (1 µl) of the culture was spotted in the centre of each well containing LB medium with agar and again incubated overnight at 37°C. Migration of the culture was then measured. The isolate was classified as non-motile when the average diameter of the zone of surface motility was <5 mm.

Detection of the quorum quenching phenotype: AHL lactonase assay

All *A. baumannii* clinical strains were cultured overnight in 5 ml of modified LB broth. The culture was recovered by centrifugation at 3000 g for 10 min, resuspended, washed and finally resuspended in 5 ml of modified LB. Aliquots of the culture (1 ml) were supplemented with N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL at a final concentration of 10 µM) and incubated at 37°C in a shaker for 6 h. Aliquots (50 µl) of the resulting supernatant were used to detect AHL degradation in a well diffusion assay in double agar plates, in which *Chromobacterium violaceum* CV026 was added to soft agar as a biosensor together with C6HSL (5 µM) to detect inhibition of violacein synthesis [24, 25]. An overnight culture of *E.coli* BL21 (DE3)pET28-AidA strain was recovered and incubated in the presence of IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) for 4 hours to induce expression of the *aidA* gene, and the medium was then supplemented with 3-oxo-C12-HSL. The diffusion assay was carried out as previously described [24, 25].

Gene expression profiles

Gene expression studies were carried out by RT-PCR and microarray analysis. In both cases, the RNA samples were quantified in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). The quality and integrity of the samples were analyzed in an Agilent 2100 Bioanalyzer, with RNA 6000 Nano reagents and RNA Nano Chips (Agilent Technologies). Only samples with an RNA integrity number (RIN) >8 were included.

Table 1. Clinical isolates of *A. baumannii* used in this study (molecular typing and antimicrobial resistance).

Strain	Molecular Typing	Antimicrobial resistance (MIC, mg/L)												
		IMIPENEM	MEROPENEM	TIGECYCLINE	GENTAMICIN	AMIKACIN	TOBRAMYCIN	CIPROFLOXACIN	COLISTIN	NETILMICIN				
Ab1	ST-2	64	64	16	64	4	4	4	>64	≤0.5	16			
Ab2	ST-186	64	64	≤0.25	≤0.5	4	0.5	16	≤0.5	≤0.5	≤0.5			
Ab3	ST-52	16	16	≤0.25	32	<2	>64	64	≤0.5	≤0.5	>64			
Ab4	ST-169	1	<0.5	0.5	<0.5	<2	1	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5			
Ab5	ST-80	64	>64	32	64	128	1	64	64	≤0.5	32			
Ab6	ST-181	64	>64	16	>64	128	<64	64	64	≤0.5	16			
Ab7	ST-79	<0.5	1	8	>64	64	64	64	64	≤0.5	64			

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.t001>

For RT-PCR analysis of all clinical strains in both types of LB broth, the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Germany) was used to obtain Dnase-treated RNA from late log-phase cultures (OD = 0.4–0.6) in the presence of the QQ lactonase Aii20J at a final concentration of 20 μ M [25] (Fig 1). The ROS experiments were carried out with the RNA extracts in the presence of H₂O₂ for 5 minutes and in the absence of H₂O₂. The primers and UPL probe (Universal Probe Library-Roche, Germany) used in RT-PCR analysis in all clinical *A. baumannii* strains are shown in Table 3. These were designed from QS genes of the operon comprising the *AIS-0112* to *AIS-0118* cluster of *A. baumannii* ATCC 17978 [10]. We also included the *abaR* and *abaI* genes (QS system) [26] as well as genes that encoded efflux pumps [11, 12]. In relation to the QQ system, we analyzed the α/β hydrolase gene (AidA protein) by using several combinations of primers and probes with variations in the amino acid sequences (S1 Fig). Finally, we studied the ROS response associated with QS/ QQ systems. The concentrations of the samples were adjusted to achieve efficiencies of 90%–110% (50 ng of RNA), and all experiments were performed in triplicate (i.e. three RNA extracts). Analysis of controls without reverse transcriptase confirmed the absence of DNA contamination. For each strain, the expression of all genes was normalized relative to the *rpoB* gene. The normalized expression of each gene of interest was calibrated relative to expression of the reference strains, which were assigned a value of 1.0 (mean relative expression: RE). The following comparisons were made relative to the reference strains: i) QS analysis. *A. baumannii* clinical isolates of interest due to their surface motility on both types of LB medium (Fig 1) versus strains in the presence of the QQ lactonase Aii20J enzyme (the same strains in the absence of the compounds were used as reference strains); and ii) ROS responses in relation to QS (AbaI protein) and QQ mechanisms (AidA protein) were compared in clinical isolates of *A. baumannii* in the presence of H₂O₂ (for 5 minutes) and in the absence of H₂O₂ (strains with no H₂O₂ pressure were used as reference strains, CONTROL).

Overexpression of the genes was defined by RE values of ≥ 1.5 . The differences in gene expression were analyzed using a Student's t-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$ [27].

In microarray studies (Fig 2), RNA was treated with 3-oxo-C12-HSL (significant signal molecule from QS of *P.aeruginosa*) at a final concentration of 10 μ M [28] for analysis of clinical

Table 2. Mechanisms of resistance to several antimicrobials in clinical isolates of *A. baumannii*.

Strain	β -lactamase	Efflux pump (RND type)	Phenotype of antimicrobial resistance
Ab 1	OXA-24 (Plasmid harbouring AbKAB TA system)	Overexpression of AdeABC/ AdeIJK	Carbapenems, aminoglycosides, quinolones and glycines
Ab 2	OXA-24 (Plasmid harbouring AbKAB TA system)	Not overexpression RND efflux pump	Carbapenems
Ab 3	OXA-58	Overexpression of AdeABC/ AdeFGH	Carbapenems, aminoglycosides and quinolones
Ab 4	-	Not overexpression RND efflux pump	-
Ab 5	OXA-24 (Plasmid harbouring AbKAB TA system)	Overexpression of AdeABC/ AdeIJK	Carbapenems, aminoglycosides, quinolones and glycines
Ab 6	OXA-24 (Plasmid harbouring AbKAB TA system)	Overexpression of AdeABC/ AdeIJK	Carbapenems, aminoglycosides, quinolones and glycines
Ab 7	-	Absence of AdeABC efflux pump/ Overexpression AdeFGH	Aminoglycosides, quinolones and glycines

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.t002>

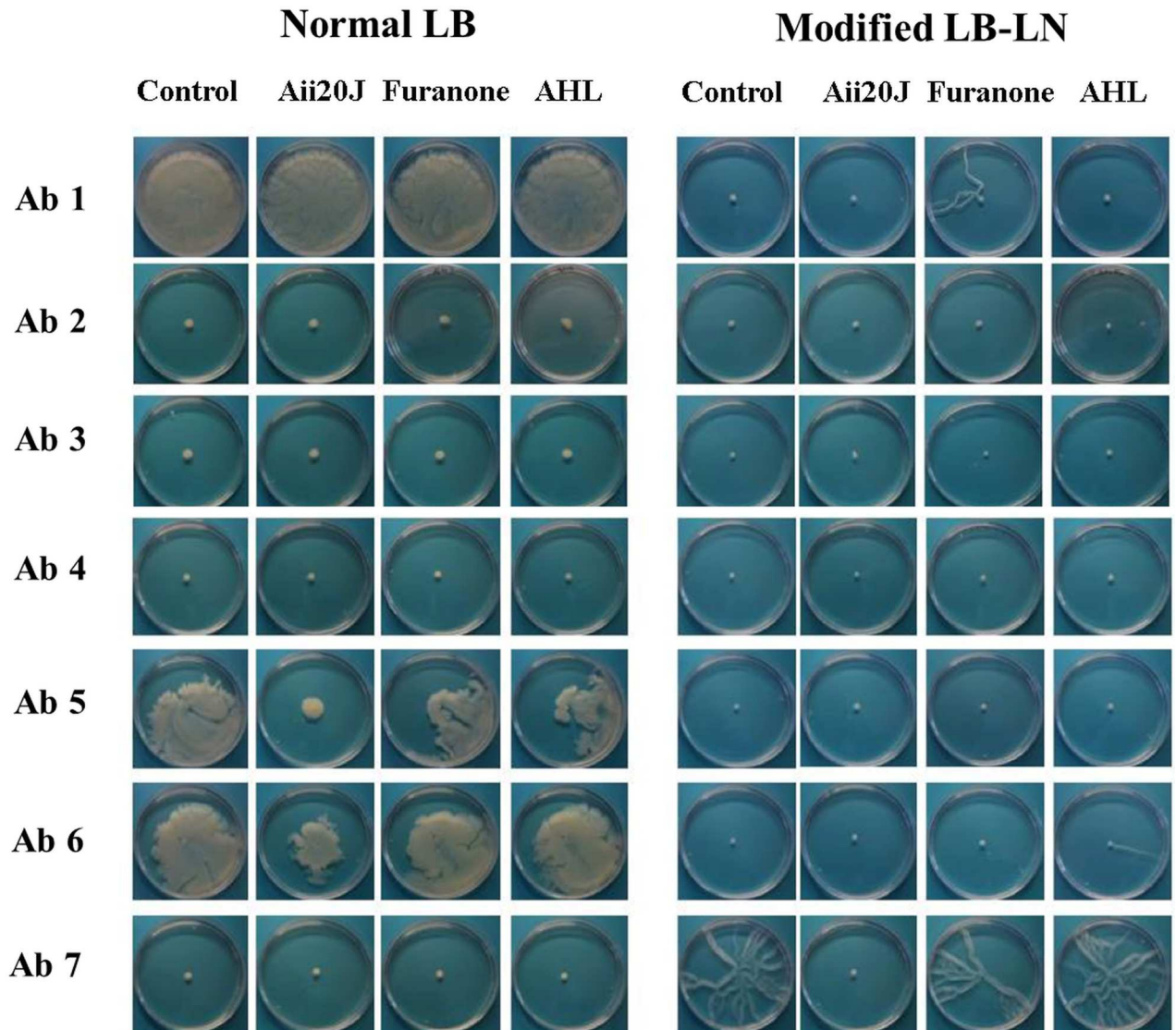


Fig 1. Surface motility of clinical strains of *Acinetobacter baumannii* on normal LB and modified LB (nutrient depleted). Normal LB contains 10g/L NaCl, 10g/L tryptone and 5g/L yeast extract and the modified LB contains 5g/L NaCl, 2g/L tryptone and 1g/L yeast extract. Inhibition of motility (in motile strains) was analyzed by the QQ enzyme (Aii20J) and molecules with this capacity (furanones and acyl homoserine, AHL).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.g001>

strain Ab1 (ST-2_clon_2010 isolate). Samples without enzymes and other compounds were used as negative controls. The arrays were designed using eArray (Agilent), on the basis of the Ab1 (ST-2_clon_2010 clinical strain genome) [22], and were carried out by Bioarray Diagnostico Genetico (Alicante, Spain). Labelling was carried out by two-colour microarray-based prokaryote analysis implemented with Fair Play III labeling, version 1.3 (Agilent). In this strain, the QS system was inhibited by 3-oxo-C12-HSL (100 μ M) (i.e. inhibition of motility and biofilm formation, Fig 2). Four independent RNA extractions per condition (biological replicates) were used in each experiment. Statistical analysis was carried out using the Bioconductor tool of the RankProd software package for the R computing environment. A gene was considered overexpressed when the ratio of the treated to the untreated preparation was ≥ 1.5 at $P < 0.05$.

Biofilm formation

The biofilm assays were conducted following the procedure described by Álvarez-Fraga L *et al.* [29]. The strains were grown on LB medium for 18 h at 37°C and used to inoculate 5 mL of LB

Table 3. Primers and UPL probes used in this study.

PRIMERS and PROBES for RT-PCR STUDIES				
Quorum Sensing	Primer Sequence (5'-3')		Taqman Probes	Ref
<i>A1S_0115</i>	Fow	TTGCCGGTTTGAAAAAGACT	11/CTTCCGC	This study
	Rev	TAAACGCACTTGGCACCATA		
<i>abaR</i>	Fow	ACCTCTGTGTTGGTCGAGTCA	96/ACAGGCAG	This study
	Rev	CGTGCTTCCTCCAAAAAT		
<i>piiT</i>	Fow	CTTTGGTCTAGTGTGGTCATGC	102/TGGCTGAG	This study
	Rev	AAACAAAGTCGCGCAAATG		
<i>bfmS</i>	Fow	TGAAGGAGTCGCTCGACAA	38/GGAAGCAG	This study
	Rev	CAGATGCGTCAGAAATCCAAT		
<i>csuD</i>	Fow	CCTGAAAACCCTAGTTCGAA	60/TGGGGAAG	This study
	Rev	TTTTACTGGGTGACATTATTACCG		
<i>adeB</i>	Fow	CGAGTGGCACAACCTAGCATC	61/CTGGGCAA	[27]
	Rev	CCTTGTCTTGGCTGCACTCT		
<i>adeG</i>	Fow	GTCCTGAAATGGTCGTTCGT	43/CTGCCCA	[27]
	Rev	AGCTTCTGCTTGGCTAGATGA		
<i>adeJ</i>	Fow	CCTATTGCACAATATCCAACGA	119/TTGGTGGT	[27]
	Rev	AGGATAAGTCGAGCAATCG		
<i>rpoB</i>	Fow	CGTGTATCTGCGCTTGG	131/CTGGTGGT	[27]
	Rev	CGTACTTCGAAGCCTGCAC		
<i>abal</i>	Fow	CCGCTACAGGGTATTTGTTGAAT	6FAM-TGGATTCTCTGTCTTGAGCCACGACA-BBQ	This study
	Rev	GCAGGGAATAGGCATTCCATTG		
Quorum Quenching	Primer Sequence (5'-3')		Taqman Probes	Ref
<i>aidA</i>	Fow	GGGAACCTTCTTTCGGTGGAG	145/CAGCCACC	This study
	Rev	AACAGCAGCAAGTCGATTATCA		
	Fow	GGGACTTCTTTTCGGTGGAG	145/CAGCCACC	This study
	Rev	GCAGCAAGCCGGTTATCA		
	Fow	CCTAACCTTGCATTAGGGCTATTA	53/TGGCAGAG	This study
	Rev	CGGTAACCACAGGTCGGTA		
PRIMERS for SEQUENCING ANALYSIS				
Quorum Quenching	Primer Sequence (5'-3')		Ref	
<i>aidA</i> gene (Putative lactonase)	AidA Fow	ATGGGTAAAAGTCTAAATAA	This study	
	AidA Rev	CTTGACTGGAACGATG		
	AidA FowINT1	GCCTATGCACGTAGCC	This study	
	AidA RevINT1	GGGGGCAACAGAGTCGG		
	AidA FowINT2	GCGAGATAGCCTGAAT	This study	
	AidA FowINT2	GCCTATGCCCGTAGC		
PRIMERS for CLONING the <i>aidA</i> gene in <i>E.coli</i> strain BL21 (DE3)				
Primer Sequence (5'-3')				
AidA pET Fow (<i>XhoI</i> enzyme restriction site)	GGAATTCCATATGGGTAAGTCTAAATAA			
AidA pET Rev (<i>NdeI</i> enzyme restriction site)	GCGGAGCTCTTACTTGACTGGAACGATGCG			

Ref, References.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.t003>

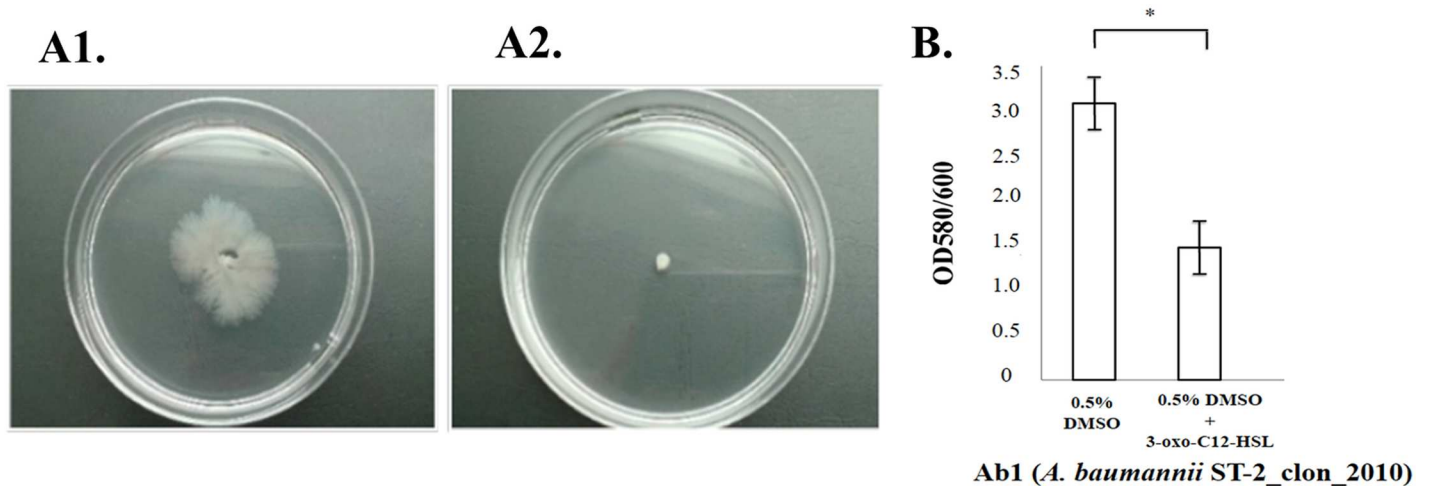


Fig 2. The figure shows inhibition of motility (A2) and biofilm formation (B) in Ab1 in the presence of 3-oxo-C12-HSL (QQ activity). As a negative control, motility and biofilm formation in Ab1 were studied in the presence of 0.3% dimethyl sulfoxide (DMSO), which is a solvent for 3-oxo-C12-HSL (A1 and B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.g002>

broth. Cultures were grown at 37°C with shaking. Overnight cultures were pelleted, washed and resuspended in 5 mL of modified LB-LN. A 1:100 dilution of each strain was incubated at 37°C for 48 h under static conditions. Growth of the culture was measured at OD₆₀₀ to estimate total cell biomass. Biofilm formation was quantified by staining with crystal violet and solubilised with ethanol-acetone. The OD₅₈₀/OD₆₀₀ ratio was used to normalize the amount of biofilm formed to the total cell content of each sample tested, to overcome variations due to differences in bacterial growth under several experimental conditions. Eight independent replicates were considered. A student's test was performed to evaluate the statistical significance of the observed differences between the strains considered.

Sequencing of the α/β hydrolase gene (AidA) in clinical strains of *A. baumannii*

The primers listed in Table 3 were used to sequence and amplify the gene that encoded the protein in all clinical strains isolated in this study. To confirm the absence of this gene, we analyzed the genome of Ab7 (*A. baumannii* strain Ab421_GEIH-2010 genome) [23]. Moreover, the nucleotide sequences of AbaR and AbaI proteins did not reveal any mutations of interest (data not shown).

Expression of AidA protein in *E. coli* strains

DNA isolated from *Acinetobacter baumannii* strain ST-2_clon_2010 (Ab1) was used to clone the full-length AidA protein. The primers used to clone this gene in *E. coli* strains are shown in Table 3. These primers included an internal XhoI restriction site (bold), with a stop codon (underlined). The amplified PCR products were digested using NdeI and XhoI (NEB) and purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Finally, they were ligated with T4 DNA ligase (Fermentas) into a modified pET28-a plasmid (Novagen) which includes a human rhinovirus 3C protease cleavage site. Recombinant plasmids were transformed into competent *E. coli* DH5 α cells (Novagen) for DNA production and purification (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN). The integrity of both constructs was verified by sequencing. Finally, the

plasmids were transformed into BL21(DE3) pLysS competent cells (Novagen) to yield the *E. coli* BL21(DE3)pET28-AidA construct.

Results

Surface motility in clinical strains of *A. baumannii*

The motility data for all clinical strains of *A. baumannii* are shown in Fig 1. Around 85% of the isolates did not exhibit surface motility on either medium tested. In those strains displaying surface motility, the lactonase Aii20J was the most effective in inducing QQ activity and thus inhibiting the motility (Ab 5 and Ab 6 on normal LB versus Ab 7 on modified LB-LN).

Genes associated with surface motility (activation of the QS system)

We used RT-PCR to study the following QS genes in the clinical strains of *A. baumannii* of interest in relation to surface motility (shown in Fig 1): *AIS_115*, *abaR*, *pilT*, *bfmS*, *csuD*, *adeB*, *adeG* and *adeJ* [10–12].

We observed only one gene, *pilT*, associated with surface motility on both types of LB medium and involved in the QS system, as indicated by a decrease in expression (RE between 1.5 and 8 times higher) in the presence of the QQ lactonase Aii20J enzyme (Ab 5 on Normal LB and Ab 7 on modified LB-LN). The most strongly expressed gene was *AIS_115* in Ab3 (RE > 100 times higher). However, as clinical strain Ab3 did not display surface motility, this gene may be associated with another function.

Finally, in the Ab3 strain, overexpression of the genes that encoded the proteins AdeB (AdeABC) and AdeG (AdeFGH) decreased significantly in presence of the QQ lactonase Aii20J enzyme. In the other clinical strains, the differences were not statistically significant.

Genes involved in inhibition of surface motility (activation of the QQ system)

Stacy *et al.* used non-native N-acyl homoserine lactones such as 3-oxo-C12-HSL to study attenuation of the QS system (QQ activity) [28]. We carried out microarray analysis of *A. baumannii* ST-2_clon_2010 (the genome of which has been sequenced) cultured with 3-oxo-C12-HSL, in order to analyze the expression profile of the genes involved in the QQ system in clinical strains of *A. baumannii* (the solvent used, dimethyl sulfoxide [DMSO] was included as a blank control). We also confirmed activation of the QQ system in this strain with 3-oxo-C12-HSL, by inhibition of surface motility and a significant decrease in biofilm formation (Table 4 and Fig 2).

Only 13 genes were overexpressed in the presence of 3-oxo-C12-HSL in this *A. baumannii* strain (GEO database arrays GSE87009). The most strongly expressed gene (5.01) was a gene encoding an α/β hydrolase enzyme, AidA (putative QQ ENZYME, GI:1056209154). Around 46.15% of the genes that were overexpressed were involved in the synthesis of the acyl-homoserine lactones (AHLs), including AHL synthase (GI:1056211405). Moreover, the results of the microarray analysis revealed overexpression of the genes coding for the following proteins: i) glutathione-s-transferase (DETOXIFICATION, GI:1056212294); ii) RND efflux pump (TRANSPORTER, GI:1056211398); iii) outer membrane protein-OmpA-Like (TRANSPORTER/VIRULENCE, GI:1056212337); iv) entericidin EcnA/B family (STRESS RESPONSE, GI:1056212369); and v) a new PORIN (GI:1056211397) (Table 4).

Detection of the *aidA* gene in clinical isolates

To confirm the role of AidA as a new QQ enzyme, we studied the presence of this protein in the clinical strains of *A. baumannii* that did not display surface motility on modified LB-LN

Table 4. Gene expression in *A. baumannii* ST-2_clon_2010 (Ab1) revealed by microarray assays in the presence of 3-oxo-C12-HSL.

GenBank no. Sequences ^a	Gene name	Fold change	Function	
GI:1056209154	Alpha/beta hydrolase	5.01	Quorum Quenching	
GI:1056211401	Acyl-dehydrogenase (Acyl-CoA dehydrogenase)	4.83	AHLs synthesis	
GI:1056209152	Short-chain dehydrogenase (3-oxoacyl-ACP reductase)	4.79		
GI:1056211410	Amp-binding enzyme (Acyl CoA synthase)	4.31		
GI:1056211399	Non-Ribosomal Peptide synthase (Long chain fatty-acid CoA ligase)	3.91		
GI:1056209152	Kr domain protein (3-oxoacyl-ACP reductase)	3.27		
GI:1056211405	Acyl-homoserine-lactone synthase	3.18		
GI:1056211426	Phosphopantetheine attachment domain (Beta-ketoacyl-ACP synthetase)	2.72		
GI:1056212294	Glutathione-S-transferase	2.56		Detoxification
GI:1056211398	Mmpl family protein (RND transporter)	1.89		Efflux pump
GI:1056212337	Outer membrane protein omp38	1.61		OmpA porin
GI:1056212369	Enterocidin EcnA/B family	1.51	Stress response	
GI:1056211397	Porin	1.50	Porin	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.t004>

(Ab2, Ab3, Ab4, Ab5 and Ab6) and in the only strain displaying surface motility (Ab7). We found the α/β hydrolase gene encoded an AidA protein (QQ enzyme) in all non-motile isolates (67% from respiratory tract) (Table 5). The AidA enzyme showed variable levels of amino acid in different clinical strains of *A. baumannii* (S1 Fig). Importantly, the α/β hydrolase gene was not amplified in strain Ab7 (reference strain displaying surface motility). The absence of this gene was confirmed by sequencing the genome of strain Ab7 (which belongs to the PFGE-HUI-1 clone), which has recently been published as *A. baumannii* strain Ab421_GEIH-2010 [23]. Other characteristics of this isolate were that it did not have an AdeABC efflux pump and it did not harbour OXA 24 β -lactamase in a resistance plasmid (Table 5).

Finally, in order to detect the presence of QQ activity in the *A. baumannii* strains used in this study, we conducted well diffusion assays with *Chromobacterium violaceum* CV026 as a biosensor. This bacterium produces violacein in the presence of short-chain AHLs such as C₆HSL; however, the presence of long-chain AHLs inhibits violacein production [24]. In all strains except Ab7 (the reference strain exhibiting surface motility) and the control strain, no halo was detected in the plates, and therefore the 3OC12HSL with which the cultures were incubated was not present (Fig 3).

Functional characterization of the AidA protein by overexpression in *E. coli* strains

We used *E. coli* BL21 (DE3) as a model to overexpress the AidA protein (pET28-AidA) (Fig 4A, line a.2). Three QS systems have been described in this model [26]:

1. Unknown (synthase), SdiA (receptor) and 3-oxo-C8-HSL (signal synthesized in others bacteria). This system has been associated with motility and acid resistance. [30].
2. LuxS (synthase), LsrB (receptor) and AI-2 (signal). Lsr operon expression (AI-2 uptake) [31].

Table 5. Detection of the α/β hydrolase gene (AidA protein) in clinical isolates by PCR. Features of the isolates used in this study.

Strain	Quorum Sensing system	Surface Motility	Type of infection
	α/β hydrolase gene, AidA protein: GI:1056209154 ^a	(Modified LB-LN)	
Ab 1	+	No	Respiratory
Ab 2	+	No	Ulcer
Ab 3	+	No	Respiratory
Ab 4	+	No	Respiratory
Ab 5	+	No	Respiratory
Ab 6	+	No	Exudate
Ab 7	-	Yes	Blood

^a Genome *A. baumannii* ST-2_clon_2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.t005>

3. Unknown (synthase), QseC (receptor) and AI-3 (signal synthesized in other bacteria). This system has been implicated in virulence, motility and biofilm formation [32].

We confirmed the quorum quenching activity of this AidA protein by twitching motility studies with these cells in the presence of IPTG (Fig 4B in which *E. coli* BL21 [DE3] pET28-AidA showed no motility) and quantification of bacterial biofilm (significant decrease in biofilm formation in *E. coli* BL21 [DE3] pET28-AidA, Fig 4C). The quorum quenching activity of this protein was also detected by diffusion assay in the presence of the biosensor *C. violaceum* strain CV026: no halo was produced by the supernatant of the strain BL21 [DE3] pET28-AidA incubated with 3-oxo-C12-HSL (Fig 4D).

Relationship between QS/QQ systems and oxidative stress mechanism (ROS response)

We studied the involvement of QS/QQ systems in the ROS response by RT-PCR. In the presence of H₂O₂, expression of the α/β hydrolase gene (QQ system) decreased significantly (P<0.05), while the *abaI* gene (QS system) was significantly overexpressed (P<0.05) (Table 6).

Discussion

The QS system enables bacterial populations to live and proliferate in an environment with effective intercellular communication [33]. In clinical isolates of *A. baumannii*, little is known about the cascade of genes controlled by this system and associated with various mechanisms, including surface motility (phenotypic expression). In *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, the *AIS-0112* to *AIS_0118* operon has been associated with activation of the QS system, and the *pilT* gene has been related to motility [10]. In this study, only *pilT* expression (surface motility) was controlled by QS in the LB broth used: normal LB and modified (nutrient depleted) LB-LN.

Amino acid sequences and architecture of the QQ enzymes are diverse [34]. These enzymes have several biological roles: QS-signal clearing in *A. tumefaciens* [35, 36], recycling of QS signals (*Pseudomonas aeruginosa* model) in organisms that produce QS molecules [37, 38], detoxification and, finally, disturbance of QS signalling by an organism that does not produce QS signals, but may take advantage of QQ processes, such as the hosts of QS-emitting pathogens (bacterial competition) [39].

Several α/β hydrolase enzymes have been described in different pathogens [1, 34, 40–42]. In this study, we identified in presence of 3-oxo-AHL, a new QQ enzyme (α/β hydrolase gene,

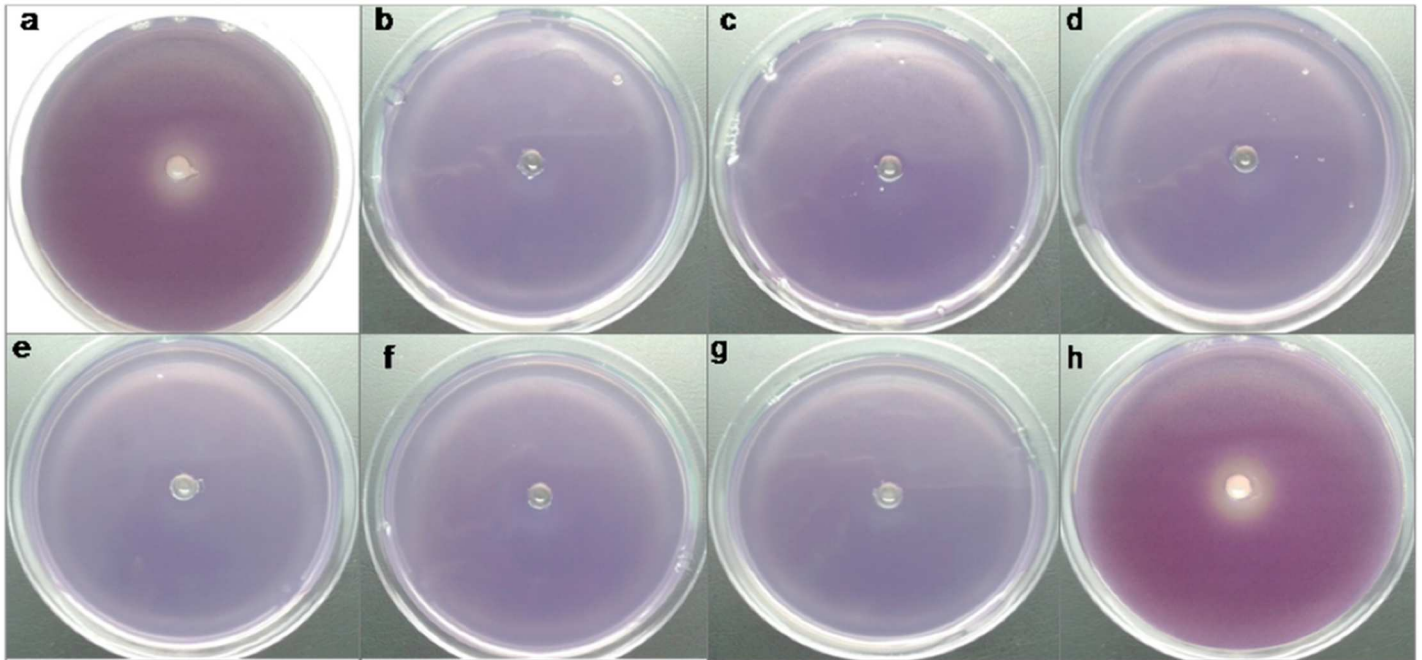


Fig 3. Diffusion assays carried out with the biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 to detect the presence of QQ activity in the clinical strains of *A. baumannii* under study. The presence of a halo indicates inhibition of violacein production by the presence of 3-oxo-C12-HSL and, therefore, the absence of QQ activity (a, h). The absence of a halo indicates QQ activity (b, c, d, e, f, g). a) Control; b) Ab1; c) ab2; d) Ab3; e) Ab4; f) Ab5; g) Ab6; h) Ab7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.g003>

AidA) which was present in all strains of *A. baumannii* that did not exhibit surface motility. Moreover, the QQ activity from this protein (inhibition of the motility and biofilm) was confirmed by overexpression in *E. coli* (which does not produce AHLs). Interestingly, Weiland and collaborators described several QQ enzymes with hydrolytic activity against AHLs and AI-2 signals [43, 44]. Hence, this QQ enzyme (AidA protein) could contribute in bacterial competition, as it is capable of hydrolyzing the signalling molecules mediated between species.

Recent studies suggest that the ROS response is controlled by the QS system in *A. baumannii* [14, 15]. Several studies have suggested the involvement of the QQ mechanism under ROS response [45, 46]. Veal *et al.* [47] and other researchers [48] have suggested that members of the glutathione-S-transferase family of proteins are important for protecting cells from oxidative stress. The results of microarray assays showed overexpression of the *glutathione-s-transferase* and α/β *hydrolase* (AidA protein) genes in the Ab1 clinical strain (*A. baumannii* ST-2_clon_2010) [22] in the presence of 3-oxo-C12-HSL [28]. Moreover, in *Deinococcus radiodurans*, which is known for its resistance to oxidative stress, the AHL level was “shielded” by QQ enzymes under non-stress conditions (normal conditions), whereas AHLs accumulated when *D. radiodurans* was exposed to oxidative stress [49]. In the aforementioned study, the synthetic form of the AHL enzyme (DsqI) was immediately induced on exposure to H₂O₂, while the expression of QQ enzymes began to increase after exposure to H₂O₂ for about half an hour. The QS system (DqsIR) in this pathogen mediated the adaptive strategy in response to oxidative stress (ROS response) [49]. In the present study, we confirmed the presence of the AidA protein (new QQ enzyme) in all non-motile clinical strains of *A. baumannii*. The twitching motility and biofilm studies with overexpression of this protein in *E. coli* BL21(DE3) confirmed its role as a quorum quenching enzyme.

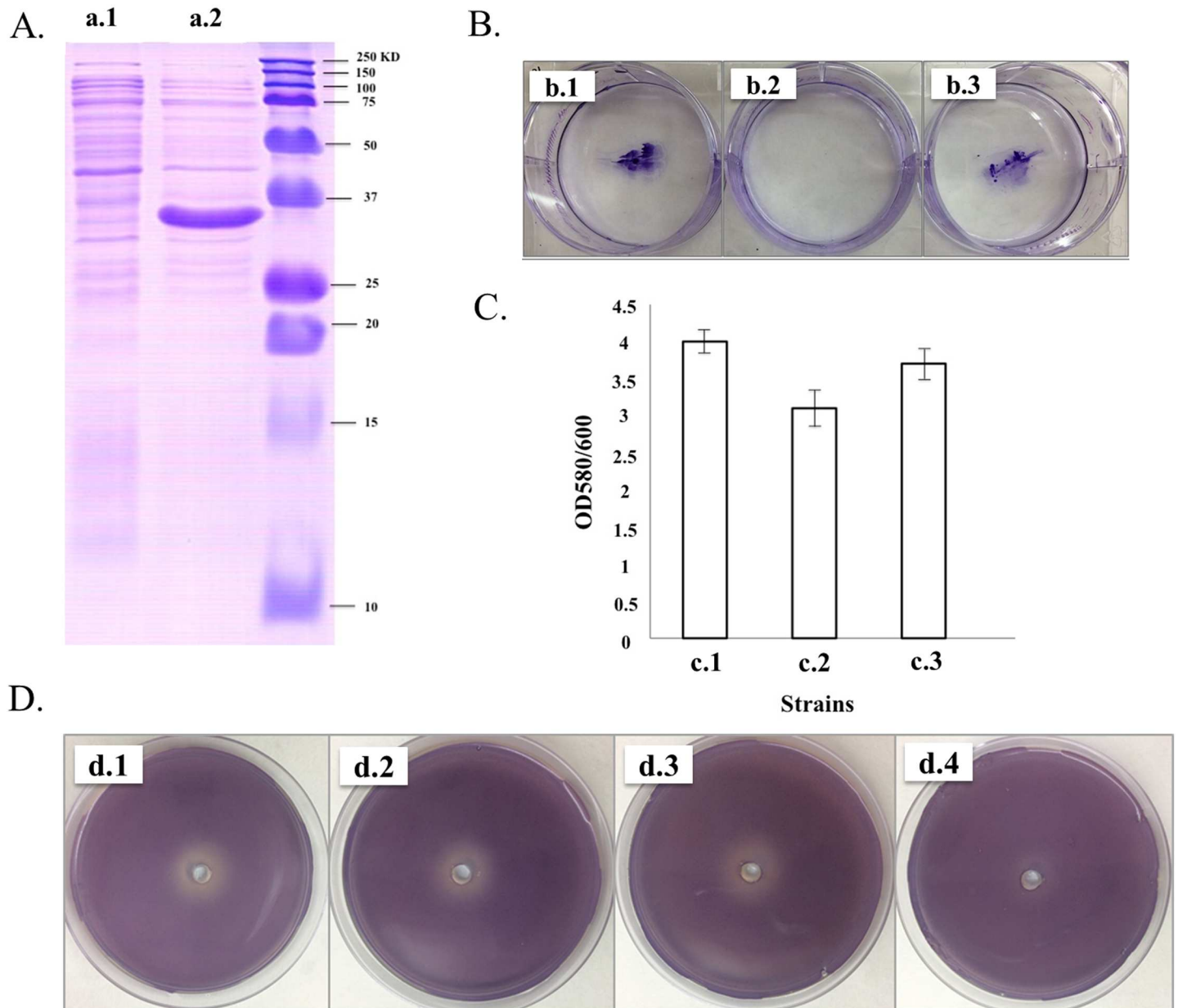


Fig 4. Studies with AidA protein overexpressed in *E. coli* BL21(DE3). **A.** SDS PAGE with expression of AidA protein in *E. coli* BL21(DE3): a.1. *E. coli* BL21(DE3)pET28 and a.2 *E. coli* BL21(DE3)pET28-AidA; **B.** Twitching motility: b.1 *E. coli* BL21(DE3), b.2 *E. coli* BL21(DE3)pET28-AidA and b.3 *E. coli* BL21(DE3)pET28; **C.** Quantification of biofilm formation by crystal violet staining: c.1 *E. coli* BL21(DE3), c.2 *E. coli* BL21(DE3)pET28-AidA and c.3 *E. coli* BL21(DE3)pET28. The differences were statistically significant (Student's t-test, $P < 0.05$); **D.** Detection by plate diffusion assay of QQ activity after incubation in presence of 3OC12HSL: d.1. Control (LB); d.2. *E. coli* BL21(DE3); d.3. *E. coli* BL21(DE3)pET28; d.4. *E. coli* BL21(DE3)pET28-AidA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.g004>

Finally, the AidA protein was downregulated (QQ system attenuation) in the presence of H_2O_2 (ROS stress), unlike the AbaI protein, which was upregulated in clinical strains of *A. baumannii*.

In conclusion, we researched the Quorum Sensing/Quenching systems in clinical isolates of *A. baumannii*. Most of the strains were not surface motile (84%) and were of respiratory origin (67%). Only the *pilT* gene was involved in surface motility and the QS system in these strains. A new QQ enzyme (α/β hydrolase gene, AidA protein) was detected by array analysis in the

Table 6. Relative expression (RE) under normal conditions relative to the presence of H₂O₂ (ROS stress) in clinical strains of *A. baumannii* of genes involved in the QQ system (α/β hydrolase gene, AidA protein) and the QS system (*abaI* gene, AHL synthase protein).

Strain	Quorum Quenching system		Quorum Sensing system	
	α/β hydrolase gene, AidA protein: GI:1056209154 ^a		<i>abaI</i> gene, AHL synthase protein: A1S_0109 ^b	
	CONTROL (References)	H ₂ O ₂	CONTROL (References)	H ₂ O ₂
Ab 1	1	0.36	1	1.60
Ab 2	1	0.88	1	1.61
Ab 3	1	0.53	1	3.58
Ab 4	1	0.55	1	1.64
Ab 5	1	0.69	1	2.98
Ab 6	1	0.62	1	3.73
Ab 7	-	-	1	1.54

^a. Genome *A. baumannii* ST-2_clon_2010 (Ab1).

^b. Genome *A. baumannii* ATCC 17978.

Control: RNA extraction from clinical isolates under normal conditions; **H₂O₂:** RNA extractions from clinical isolates after 5 minutes in the presence of H₂O₂.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174454.t006>

presence of the external signal 3-oxo-C12-HSL. All of the non-motile strains of *A. baumannii* had the AidA protein (QQ system activation). The function of this protein as a QQ enzyme was confirmed by its expression in *E.coli* BL21(DE3) strain that produces AI-2 signalling molecules. Finally, the findings confirmed that regulation of ROS stress (presence of H₂O₂) by the QS/QQ systems in clinical strains of *A. baumannii*.

Nucleotide sequence accession number

The Ab ST-2_clon GEIH-2010 (Ab1) whole genome shotgun project has been deposited in the DDBJ/ENA/GenBank under accession number LJHB00000000. The version described in this paper is version LJHB01000000, which consists of sequences LJHB01000001 LJHB01000077. The genome sequence of Ab421 GEIH- 2010 strain (Ab7) has been deposited in GenBank under the accession number CP014266. Both WGS studies are part of the II Spanish Multicenter Study. GEIH-REIPI *Acinetobacter baumannii* 2000–2010 project (PRJNA308422).

Supporting information

S1 Fig. Amino acid sequences of the AidA protein (new QQ enzyme) isolated from clinical strain.

(TIF)

Acknowledgments

We are grateful to the following organizations and researchers who participated in the study: Virgen Macarena (Jesús Rodríguez-Baño, Alvaro Pascual, Felipe Fernández Cuenca); Virgen Rocío (Jerónimo Pachón, José Miguel Cisneros, José Garnacho, Antonio Gutierrez-Pizarraya, Juan Antonio Márquez-Vácaro); Hospital Marqués de Valdecilla (Luis Martínez-Martínez, María Eliecer Cano, M. Carmen Fariñas); Hospital Clinic (Jordi Vila); Hospital SAS La Línea (Antonio Sánchez-Porto, Gloria Esteban Meruendano, Luis Barbeyto-Vales, Javier Casas-Ciria, Luis Vallejo); Complejo hospitalario de Ourense (Begona Fernández-Pérez, José Carlos Villar-Chao); Hospital Gregorio Marañón (Belén Padilla-Ortega, Emilia Cercenado-Mansilla);

Hospital de Navarra (José Javier García-Irure); Hospital Costa del Sol-Marbella (Alfonso del Arco Jiménez); Hospital General de Valencia (Concepción Gimeno-Cardona, Juan Carlos Valía, Núria Tormo-Palop, Vicente Abril, Josefina Rifa, Maria Jesus Martinez-Garcia); Consorci Hospitalari de Vic (Joseph Vilaró-Pujals, Marian Navarro Aguirre, Ana Vilamala); Policlínica Guipúzkoa (José Antonio Jiménez-Alfaro, Carlos Reviejo-Jaca); Hospital Puerta del Mar (Pilar Marín Casanova, Francisca Guerreo, Evelyn Shaw, Virginia Plasencia); Complejo Hospitalario de Soria (Teresa Nebreda-Mayoral, María José Fernández-Calavia, Susana García de Cruz, Carmen Aldea-Mansilla); Hospital Universitario de Alicante (Esperanza Merino de Lucas, Alfredo Zorraquino, Sergio Reus-Bañuls); Hospital Infanta Cristina (Eugenio Garduno-Eseverri, Luis López Sánchez); Hospital Universitario Central de Asturias (Ana Fleites-Gutiérrez, Azucena Rodríguez-Guardado, Alfonso Moreno); Hospital Donostia (José María García-Arenzana Anguera); Complejo Hospitalario Torrecárdenas (Serafín López-Palmero, Manuel Rodríguez-Maresca); Complejo Hospitalario Xeral-Calde Lugo (Fernando García-Garrote, José Varela-Otero, María del Pilar Alonso); Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (Elisa Vidal-Verdú, Fernando Rodríguez-López); Hospital Universitario Santiago Compostela (Fernanda Pardo-Sánchez, E. Ferrer-Vizoso, B. Regueiro-Garcia); Hospital Sant Pau (Mercé Gurgui, Roser Pericas, Virginia Pomar); Hospital Galdakao-Usansolo (Pedro María Olaechea-Astigarraga, Rafael Ayarza-Igartua); Hospital Son Dureta (María Dolores Maciá-Romero, Enrique Ruiz de Gopegui-Bordes); Hospital Puerta de Hierro (María Isabel Sánchez-Romero); Hospital Juan Grande (Jesús García-Mata, María José Goyanes, Cristina Morales-Mateos); Hospital San Cecilio (José Hernández-Quero, Trinidad Escobar-Lara); Hospital Sant Joan de Reus (Frederic Ballester-Bastardie, Simona Iftimie, Isabel Pujol-Bajador); Hospital de Motril (María Isabel Galán-Navarro, María Luz Cádiz-Gurrea); Hospital San Agustín (Carmen Amores-Antequera, Montserrat Gómez Purificación Cantudo); Hospital de Granollers (Carmen Martí-Salas, Jordi Cuquet-Peragosa, Antonio Moreno-Flores, Luis Anibarro-García); Hospital de Segovia (Susana Hernando-Real, Pablo A. Carrero-González); Complejo Hospitalario de Pontevedra (María Angeles Pallarés-González, Sergio Rodríguez-Fernández); Hospital de Bellvitge (Miquel Pujol-Rojo, Fe Tubau); Hospital Virgen de la Victoria de Málaga (Enrique Nuno-Alvarez, María Ortega-Torres); Hospital Doctor Moliner (Salvador Giner-Almaraz, María Rosa Roca-Castelló, Manuela Castillo, Elena Hortelano); Hospital 12 de Octubre (Fernando Chaves-Sánchez, Ana García-Reyne); Hospital del Mar (Juan Pablo Horcajada-Gallego, Concha Segura); Hospital San Agustín de Avilés (Gema Sierra-Dorado, Raquel Yano-Escudero); Complejo Hospitalario Materno Insular de Gran Canaria (María Elena Dorta-Hung, Cristóbal del Rosario Q). Email for lead author of the GEIH-REIPI (GEMARA-SEIMC) *Acinetobacter baumannii* 2000–2010 project (PRJNA308422): MA.del.Mar.Tomas.Carmona@sergas.es.

Author Contributions

Funding acquisition: MT.

Investigation: ML CM LFG LB AM FMR GB AO.

Methodology: ML CM LFG LB AM FMR GB AO.

Project administration: MT.

Supervision: MT.

Writing – original draft: MT.

Writing – review & editing: MT.

References

1. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013; 77(1):73–111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12> PMID: 23471618
2. Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322:67–84. PMID: 18453272
3. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55:165–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165> PMID: 11544353
4. Rickard AH, Palmer RJ, Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF, Eglund PG, et al. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol.* 2006; 60(6):1446–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05202.x> PMID: 16796680
5. Semmelhack MF, Campagna SR, Federle MJ, Bassler BL. An expeditious synthesis of DPD and boron binding studies. *Org Lett.* 2005; 7(4):569–72. <https://doi.org/10.1021/ol047695j> PMID: 15704896
6. Sun J, Daniel R, Wagner-Döbler I, Zeng AP. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol.* 2004; 4:36. Epub 2004/09/29. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-36> PMID: 15456522
7. Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol.* 2010; 36(4):349–60. Epub 2010/09/18. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.512269> PMID: 20846031
8. Kang YS, Jung J, Jeon CO, Park W. *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J Microbiol.* 2011; 49(1):29–34. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0315-y> PMID: 21369976
9. Gonzalez RH, Nusblat A, Nudel BC. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res.* 2001; 155(4):271–7. Epub 2001/04/12. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(01\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(01)80004-5) PMID: 11297357
10. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology.* 2011; 157(Pt 9):2534–44. Epub 2011/06/28. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049791-0> PMID: 21700662
11. Kvist M, Hancock V, Klemm P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(23):7376–82. <https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08> PMID: 18836028
12. He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J, et al. Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(8):4817–25. <https://doi.org/10.1128/AAC.00877-15> PMID: 26033730
13. Richmond GE, Evans LP, Anderson MJ, Wand ME, Bonney LC, Ivens A, et al. The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. *MBio.* 2016; 7(2).
14. Dong YH, Wang LY, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007; 362(1483):1201–11. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2045> PMID: 17360274
15. Ochiai S, Yasumoto S, Morohoshi T, Ikeda T, AmiE, a novel N-acylhomoserine lactone acylase belonging to the amidase family, from the activated-sludge isolate *Acinetobacter* sp. strain Ooi24. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(22):6919–25. Epub 2014/08/31. <https://doi.org/10.1128/AEM.02190-14> PMID: 25172868
16. Bzdrenga J, Daudé D, Rémy B, Jacquet P, Plener L, Elias M, et al. Biotechnological applications of quorum quenching enzymes. *Chem Biol Interact.* 2016.
17. Vijayakumar S, Rajenderan S, Laishram S, Anandan S, Balaji V, Biswas I. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Front Public Health.* 2016; 4:105. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00105> PMID: 27252939
18. Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR, Ochsner UA, West SE, et al. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol.* 1999; 34(5):1082–93. PMID: 10594832
19. Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun.* 2014; 82(8):3417–25. Epub 2014/06/04. <https://doi.org/10.1128/IAI.01600-14> PMID: 24891106
20. Heindorf M, Kadari M, Heider C, Skiebe E, Wilharm G. Impact of *Acinetobacter baumannii* superoxide dismutase on motility, virulence, oxidative stress resistance and susceptibility to antibiotics. *PLoS One.* 2014; 9(7):e101033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101033> PMID: 25000585
21. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82(2):291–5. PMID: 9129943

22. López M, Rueda A, Florido JP, Blasco L, Gato E, Fernández-García L, et al. Genomic Evolution of Two *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains from ST-2 Clones Isolated in 2000 and 2010 (ST-2_clon_2000 and ST-2_clon_2010). *Genome Announc.* 2016; 4(5).
23. López M, Álvarez-Fraga L, Gato E, Blasco L, Poza M, Fernández-García L, et al. Genome Sequence of a Clinical Strain of *Acinetobacter baumannii* Belonging to the ST79/PFGE-HUI-1 Clone Lacking the AdeABC (Resistance-Nodulation-Cell Division-Type) Efflux Pump. *Genome Announc.* 2016; 4(5).
24. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology.* 1997; 143 Pt 12:3703–11.
25. Mayer C, Romero M, Muras A, Otero A. Aii20J, a wide-spectrum thermostable N-acylhomoserine lactonase from the marine bacterium *Tenacibaculum* sp. 20J, can quench AHL-mediated acid resistance in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(22):9523–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6741-8> PMID: 26092757
26. Castillo-Juárez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, Tomás M, Pérez-Eretza B, García-Contreras SJ, et al. Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J Clin Cases.* 2015; 3(7):575–98. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.575> PMID: 26244150
27. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(11):5247–57. <https://doi.org/10.1128/AAC.00730-13> PMID: 23939894
28. Stacy DM, Welsh MA, Rather PN, Blackwell HE. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native N-Acyl homoserine lactones. *ACS Chem Biol.* 2012; 7(10):1719–28. Epub 2012/08/03. <https://doi.org/10.1021/cb300351x> PMID: 22853441
29. Álvarez-Fraga L, Pérez A, Rumbo-Feal S, Merino M, Vallejo JA, Ohneck EJ, et al. Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence.* 2016; 7(4):443–55. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1145335> PMID: 26854744
30. Soares JA, Ahmer BM. Detection of acyl-homoserine lactones by *Escherichia* and *Salmonella*. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14(2):188–93. Epub 2011/03/01. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.01.006> PMID: 21353625
31. Kendall MM, Sperandio V. Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007; 23(1):10–5. Epub 2006/11/30. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3280118289> PMID: 17133078
32. Moreira CG, Weinshenker D, Sperandio V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun.* 2010; 78(3):914–26. Epub 2009/12/24. <https://doi.org/10.1128/IAI.01038-09> PMID: 20028809
33. Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmund GP. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 25. Netherlands2001. p. 365–404. PMID: 11524130
34. Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev.* 2016; 40(1):86–116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038> PMID: 26432822
35. Carlier A, Chevrot R, Dessaux Y, Faure D. The assimilation of gamma-butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004; 17(9):951–7. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.9.951> PMID: 15384485
36. Chai Y, Tsai CS, Cho H, Winans SC. Reconstitution of the biochemical activities of the AttJ repressor and the AttK, AttL, and AttM catabolic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 2007; 189(9):3674–9. <https://doi.org/10.1128/JB.01274-06> PMID: 17307843
37. Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(10):5941–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5941-5949.2003> PMID: 14532048
38. Huang JJ, Petersen A, Whiteley M, Leadbetter JR. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(2):1190–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1190-1197.2006> PMID: 16461666
39. Tang K, Zhang XH. Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. *Mar Drugs.* 2014; 12(6):3245–82. <https://doi.org/10.3390/md12063245> PMID: 24886865
40. Mei GY, Yan XX, Turak A, Luo ZQ, Zhang LQ. AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(15):4933–42. Epub 2010/06/08. <https://doi.org/10.1128/AEM.00477-10> PMID: 20525860

41. Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, Quitschau M, Grond S, Streit WR. Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(1):224–33.
42. Krysciak D, Schmeisser C, Preuss S, Riethausen J, Quitschau M, Grond S, et al. Involvement of multiple loci in quorum quenching of autoinducer I molecules in the nitrogen-fixing symbiont *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp. strain NGR234. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(15):5089–99. <https://doi.org/10.1128/AEM.00112-11> PMID: 21642401
43. Weiland-Bräuer N, Pinnow N, Schmitz RA. Novel reporter for identification of interference with acyl homoserine lactone and autoinducer-2 quorum sensing. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81(4):1477–89. <https://doi.org/10.1128/AEM.03290-14> PMID: 25527543
44. Weiland-Bräuer N, Kisch MJ, Pinnow N, Liese A, Schmitz RA. Highly Effective Inhibition of Biofilm Formation by the First Metagenome-Derived AI-2 Quenching Enzyme. *Front Microbiol*. 2016; 7:1098. Epub 2016/07/13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01098> PMID: 27468282
45. Kim HW, Oh HS, Kim SR, Lee KB, Yeon KM, Lee CH, et al. Microbial population dynamics and proteomics in membrane bioreactors with enzymatic quorum quenching. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012. Epub 2012/08/01.
46. Gao M, Chen H, Eberhard A, Gronquist MR, Robinson JB, Connolly M, et al. Effects of AiiA-mediated quorum quenching in *Sinorhizobium meliloti* on quorum-sensing signals, proteome patterns, and symbiotic interactions. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007; 20(7):843–56. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0843> PMID: 17601171
47. Veal EA, Toone WM, Jones N, Morgan BA. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 2002; 277(38):35523–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111548200> PMID: 12063243
48. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*. 1999; 31(4):273–300. PMID: 10517533
49. Lin L, Dai S, Tian B, Li T, Yu J, Liu C, et al. DqsIR quorum sensing-mediated gene regulation of the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans* in response to oxidative stress. *Mol Microbiol*. 2016; 100(3):527–41. <https://doi.org/10.1111/mmi.13331> PMID: 26789904



Aii20J, a wide-spectrum thermostable *N*-acylhomoserine lactonase from the marine bacterium *Tenacibaculum* sp. 20J, can quench AHL-mediated acid resistance in *Escherichia coli*

C. Mayer¹ · M. Romero^{1,2} · A. Muras¹ · A. Otero¹

Received: 9 April 2015 / Revised: 24 May 2015 / Accepted: 29 May 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Acyl homoserine lactones (AHLs) are produced by many Gram-negative bacteria to coordinate gene expression in cellular density dependent mechanisms known as quorum sensing (QS). Since the disruption of the communication systems significantly reduces virulence, the inhibition of quorum sensing processes or quorum quenching (QQ) represents an interesting anti-pathogenic strategy to control bacterial infections. *Escherichia coli* does not produce AHLs but possesses an orphan AHL receptor, SdiA, which is thought to be able to sense the QS signals produced by other bacteria and controls important traits as the expression of glutamate-dependent acid resistance mechanism, therefore constituting a putative target for QQ. A novel AHL-lactonase, named Aii20J, has been identified, cloned and over expressed from the marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20 J presenting a wide-spectrum QQ activity. The enzyme, belonging to the metallo- β -lactamase family, shares less than 31 % identity with the lactonase AiiA from *Bacillus* spp. Aii20J presents a much higher specific activity than the *Bacillus* enzyme, maintains its activity after incubation at 100 °C for 10 minutes, is resistant to protease K and α -chymotrypsin, and is unaffected by wide ranges of pH. The addition of Aii20J (20 μ g/mL) to cultures of *E. coli* K-12 to which OC6-HSL was added resulted in a significant reduction in cell viability in comparison

with the acidresistant cultures derived from the presence of the signal. Results confirm the interaction between AHLs and SdiA in *E. coli* for the expression of virulence-related genes and reveal the potential use of Aii20J as anti-virulence strategy against important bacterial pathogens and in other biotechnological applications.

Keywords Quorum sensing · Quorum-quenching acylhomoserine lactones · Lactonase · *E. coli* · SdiA

Introduction

Numerous human, animal, and plant pathogenic bacteria coordinate important biological functions, including virulence factors, antibiotic biosynthesis or biofilm formation and maturation, through a cell density-dependent gene regulation system known as quorum sensing (QS) (Swift et al. 2001; Waters & Bassler 2005; Williams et al. 2007). Bacteria produce, release, and sense extracellular small molecules called autoinducers (AIs), which are accumulated in the environment, to monitor their own population. When the concentration of AIs reaches a threshold level, the bacteria detect it and alter gene expression, approaching the behavior of a multicellular organism (Waters and Bassler 2005). Although different kinds of signal molecules have been described (LaSarre and Federle 2013) and different QS systems can appear overlapping in some pathogens, the *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) are the best studied AIs, being employed by many Gram-negative bacterial species as signal molecules involved in a broad range of biological functions (Dong et al. 2001). AHLs are constituted by an homoserine lactone ring (HSL) lined by an amide bond to a fatty acid that generally contains between 4 and 14 carbons, with or without saturation or C3

✉ A. Otero
anamaria.otero@usc.es

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Biology-CIBUS, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

² Present address: School of Life Sciences, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, UK

hydroxy or oxo substitutions (Whitehead et al. 2001). This lateral fatty acid chain confers the specificity to the QS signal. The canonic AHL-mediated QS system was first identified in the marine bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* and relies on the presence of two genes: the signal synthase LuxI and the signal receptor LuxR (Ng and Bassler 2009).

Although the Gram-negative pathogens *E. coli* and *Salmonella* do not have a *luxI* gene and do not produce AHLs, both species possess an orphan receptor SdiA, a homologue of LuxR that could respond to AHLs released by other bacterial species (Dyszal et al. 2010; Michael et al. 2001) in what is supposed to be an adaptation to complex environment in the mammalian hosts. In *E. coli*, the orphan receptor SdiA has been proposed as a key factor for this pathogenic species to survive and colonize the gastrointestinal tract of cattle (Sharma and Bearson 2013; Smith et al. 2011; Sperandio 2010). A lower prevalence of an SdiA mutant of *E. coli* O157:H7 in feces of weaned calves in comparison with the wild-type strain has been reported, indicating a crucial role of this gene in the colonization of bovine intestine (Sharma and Bearson 2013). The relevant role of the *sdiA* gene in the regulation of the glutamate-dependent resistance acid system has been demonstrated for K-12 and EHEC strains (Dyszal et al. 2010), which could constitute one of the pathways through which SdiA influences gastrointestinal colonization. Although in the current model SdiA would be activated in the AHL-rich environment of bovine rumen, triggering the glutamate-dependent acid resistance system (Soares and Ahmer 2011; Sperandio 2010) and the addition of AHLs increases the expression of genes related to the glutamate-dependent acid resistance system (Dyszal et al. 2010), the addition of AHLs to the culture media did not result in a significant increase in the acid resistance of cultures, suggesting that SdiA could be activated by a different signal and opening the possibility that molecules different from AHLs being the cognate and/or synergistic inducers of SdiA activity in *E. coli*. The picture could be even more complicated since *E. coli* uses several QS systems to coordinate its gene expression through extracellular signals, including indole signaling, the *luxS*/AI-2, and the AI-3/epinephrine QS systems (Walters and Sperandio 2006), and therefore synergistic or interference effects could be present among the different QS channels, as reported for other pathogens with complex QS networks such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Vibrio* spp. (Ng and Bassler 2009).

Since QS systems are a key in the expression of virulence factors of many important pathogens, the interference with these signaling mechanisms, known as quorum-sensing inhibition (QSI), has been proposed as a promising anti-pathogenic strategy for the control of pathogens virulence (Bjarnsholt and Givskov 2007; Dong et al. 2007; LaSarre and Federle 2013; Williams et al. 2007). Moreover, the inhibition of QS systems has other important applications, like the

control of membrane fouling (Lade et al. 2014). Two main strategies have been explored to interfere with AHL-mediated QS systems: the use of inhibitory substances that block signal reception and the enzymatic degradation of signals. Several molecules with inhibitory or antagonist activity of QS signal reception have been described (Hentzer and Givskov, 2003; LaSarre and Federle 2013). Among these, the furanones, the first QSI molecules described, are produced by the red seaweed *Delisea pulchra* and are capable of mimicking the AHLs produced by biofilm-forming bacteria by blocking signal reception, avoiding in this way surface colonization of the seaweed (Givskov et al. 1996). Furanones can protect rainbow trout from infection with *Vibrio anguillarum*, but result toxic for the fishes (Rasch et al. 2004). Recently, andrographolide, a QS inhibitor known to interfere with the AI-2 signal QS system has been demonstrated to reduce cell damage caused by avian pathogenic *E. coli* (Guo et al. 2014) demonstrating the potential of the QSI strategies to control the expression of virulence factors in *E. coli*.

The enzymatic inactivation of AIs, also known as quorum quenching (QQ) is another QSI alternative that has been largely explored. Among the different possibilities of AHL cleavage/modification mechanism, acylases and lactonases are the best characterized QS enzymes. Acylases separate the HSL ring from the fatty acid while lactonases hydrolyze the HSL ring, a reaction that also occurs spontaneously at high pH values (Yates et al. 2002). AiiA from *Bacillus* sp. strain 240B1 was the first identified enzyme with AHL-lactonase activity (Dong et al. 2000). Up to now, several lactonases have been described in genus *Bacillus* sp. (Chen et al. 2010; Liu et al. 2008; Momb et al. 2008). All of them share more than 90 % identity and are classified into the metallo- β -lactamase (MBL) superfamily. Metallo- β -lactamases (MBL) present common structural characteristics such as the tertiary structure ($\alpha\beta\beta\alpha$), the conserved zinc-binding motif and two key residues to interact with metal ions to carry out their catalytic activity (Bebrone 2007; Murphy et al. 2003). In spite of the MBLs representing the most abundant cluster among AHL-degrading enzymes, several unrelated families of enzymes with AHL-lactonase activity belonging to the phosphotriesterase (PTE) family or α/β -hydrolase-fold family have been described (Romero et al. 2014). To date, many AHL-degrading genes have been cloned and characterized from bacteria, fungi, mammalian cells, and metagenomic libraries constructed from environmental soil samples (Romero et al. 2014). Enzymes with AHL degradation activity have been tested as quorum quenchers in different areas with special mention marine fish farming industry. Degradation of AHLs by AiiA enzyme expressed in *Pichia pastoris* increased the survival of carp when co-injected with *Aeromonas hydrophila* (Chen et al. 2010), and the inclusion of the thermostable AiiA from *Bacillus* sp. strain AI96 in fish feed also reduced *A. hydrophila* infection in zebra fish (Cao et al. 2012). Heterologous expression of AiiD acylase reduced

significantly *P. aeruginosa* virulence in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Lin et al. 2003). The effectivity of the QQ strategy has been also demonstrated also in mammal models, since the inhalation of a lactonase reduced mortality in an acute lethal model of *P. aeruginosa* pneumonia (Hraiech et al. 2014).

In a previous work, strain *Tenacibaculum* sp. 20J (CECT 7426) was identified presenting with a wide-spectrum QQ activity (Romero et al. 2011a) which confers these strain important advantages in comparison with *Bacillus* strains presenting QQ capacity (Romero et al., 2014). *Tenacibaculum* sp. strain 20J, a member of the *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) group, presents a 99 % 16S rRNA gene sequence identity with *Tenacibaculum discolor* DSM 18842, which causes the fish “gliding bacterial disease” or tenacibaculosis/flexibacteriosis (Piñeiro-Vidal et al. 2008), but strain 20J can grow in the absence of marine salts which excludes its classification as member of this species (Piñeiro-Vidal et al. 2008). The QQ activity of strain 20J is constitutive and is cell-bound and has been demonstrated to be able to quench the production of AHLs by the fish pathogen *Edwardsiella tarda* (Romero et al. 2014), therefore presenting a high potential to control pathogens related to aquaculture, human health, animals, and plants or to avoid the biofilm formation (Romero et al. 2014).

Recently, three other QQ enzymes have been characterized belonging to the CFB cluster (Tang et al. 2015; Wang et al. 2012; Zhang et al. 2015) presenting unique characteristics. In this study, we cloned, over-expressed, and characterized the enzyme responsible for the QQ activity in strain 20J that resulted to be a wide-spectrum AHL-lactonase of the MBL family with very strong thermo resistance capacity and investigated the use of this enzyme to counteract the activation of the glutamate-dependent acid resistance mechanisms in *E. coli* K-12 triggered by exogenous AHLs.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Selected bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Tenacibaculum* sp. strains were routinely cultured at 22 °C on marine agar or broth (MA/MB, Difco). *E. coli* EPI300™, XL1blue, BL21(DE3) plyS, and K-12 strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with appropriate antibiotic when required. *Chromobacterium violaceum* AHL biosensor strains were routinely cultured on LB medium at 30 °C. Antibiotics were added at final concentrations of 200 µg/mL ampicillin, 12.5 µg/mL chloramphenicol, 25–50 µg/mL kanamycin, and 25 µg/mL tetracycline as required.

Cloning of AHL-lactonase Aii20J

A genomic fosmid library from *Tenacibaculum* sp. 20J was constructed with the CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre, Madison, WI). Briefly, purified chromosomal DNA from 20J was randomly sheared by passing it through a 200-µL small-bore pipette tip, treated enzymatically to generate end-repair blunt ends, fragments of 40 kb were then selected by pulsed field gel electrophoresis and ligated into the cut/linearized and dephosphorylated fosmid vector pCC2FOS. After in vitro packaging into lambda phages and infection of *E. coli* EPI300™, the bacterial cells were plated on LB supplemented with 12.5 µg/mL chloramphenicol. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and transfected *E. coli* colonies were transferred to 96-well plates. Functional screening was carried out with *C. violaceum* CV026 and VIR07 (McClellan et al. 1997; Morohoshi et al. 2008) to detect *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) and *N*-decanoyl-L-homoserine lactone (C10-HSL) degradation in concentration 60 µM.

Confirmation of QQ activity of positive clones was performed by HPLC-MS. For the analysis, crude cell extract (CCE) from positive clone was obtained from a 24-h 15-mL LB culture of *E. coli* EPI300™ cells. The culture was centrifuged for 5 min at 2000×g in order to separate the biomass from the culture media. The pellet was washed with 15 mL of phosphate buffered saline (PBS) pH 6.7, resuspended in another 5 mL of the same buffer, sonicated for 5 min on ice, and centrifuged at 16,000×g for 30 min at 4 °C. The CCE obtained was filtered through a 0.20 µm and stored at 4 °C prior to use. Aliquots of 500 µL were incubated with 10 µM C6- and C10-HSLs for 24 h at 22 °C with shaking. Then, the reaction mixtures were extracted with or without acidification to pH 2.0. The remaining AHLs were extracted three times with the same volume of ethyl acetate, evaporated under nitrogen flux and resuspended in 400 µL of acetonitrile for HPLC-MS analysis and quantification as previously described (Romero et al. 2014). PBS and *E. coli* EPI300™ with pCC2FOS without the insert plus the same amount of C6 or C10-HSL were used as controls.

The fosmid from the only clone with confirmed AHL degradation activity was sequenced using a GS-FLX Titanium Plus sequencer (Roche) and sequencer contigs assembled with Phrap software. The insert in the positive clone was sheared and fragments between 3 to 5 kb subcloned in pBluescript KS II (+) and transformed in *E. coli* EPI300™ to detect the gene responsible for QQ activity as explained before. Nine positive subclones were sequenced to confirm the responsible genetic sequence of QQ activity.

AHL degradation in genus *Tenacibaculum*

C. violaceum-based solid plate assays were carried out to detect C6- and C10-HSLs degradation activity in *Tenacibaculum* sp. strains as described before (Romero et al. 2010). Fifteen

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Source or reference
Strains		
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
CV026	AHL biosensor; Km ^r	McClellan et al. 1997
VIR07	AHL biosensor, Km ^r	Morohoshi et al. 2008
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3) plysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) dcm gal λ(DE3) pLysS Cm ^r	Promega
EPI300™ Electrocompetent cells	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL (Str ^R) nupG trfA dhfr	Epicentre
K-12	MG-1655, wild type	
XL1blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Agilent
<i>Tenacibaculum</i> sp.		
<i>Tenacibaculum</i> sp. 20J CECT 7426	Isolated from sediment of fish culture tank, Spain	Romero et al. 2011a
<i>T. aestuarii</i> JCM 13491 ^T	Isolated from tidal flat sediment, Korea	CECT ^a
<i>T. discolor</i> DSM 18842 ^T	Isolated from <i>Solea senegalensis</i> , Spain	CECT ^a
<i>T. gallaicum</i> CECT 7122 ^T	Isolated from <i>Psetta máxima</i> , Spain	CECT ^a
<i>T. lutimaris</i> DSM 16505 ^T	Isolated from tidal flat, Korea	CECT ^a
<i>T. maritimum</i> CECT 4276	Isolated from <i>Acanthopagrus schlegeli</i> , Japan	CECT ^a
<i>T. maritimum</i> NCMBI 2154 ^T	Isolated from <i>Pagrus major</i> , Japan	NCIMB ^c
<i>T. soleae</i> CECT 7292 ^T	Isolated from <i>Solea senegalensis</i> , Spain	CECT ^a
Plasmids		
pBlue Script KS II (+)	Cloning vector, Ap ^r	Agilent
pCC2FOS	Cloning vector, Cm ^r	Epicentre
pET28c(+)	Cloning vector; Km ^r	Novagen
pET28c(+)-aiiA	pET28c(+) containing <i>aiiA</i> gene from <i>Bacillus</i> sp.	This study
pET28c(+)-aii20J	pET28c(+) containing <i>aii20J</i> gene from <i>Tenacibaculum</i> sp. 20 J	This study
pET28c(+)-aiiTA	pET28c(+) containing <i>aiiTA</i> gene from <i>T. aestuarii</i> JCM 13491 ^T	This study
pET28c(+)-aiiTD	pET28c(+) containing <i>aiiTD</i> gene from <i>T. discolor</i> DSM 18842 ^T	This study
pET28c(+)-aiiTG	pET28c(+) containing <i>aiiTG</i> gene from <i>T. gallaicum</i> CECT 7122 ^T	This study
pET28c(+)-aiiTL	pET28c(+) containing <i>aiiTL</i> gene from <i>T. lutimaris</i> DSM 16505 ^T	This study
pET28c(+)-aiiTM	pET28c(+) containing <i>aiiTM</i> gene from <i>T. maritimum</i> NCMBI 2154 ^T	This study
pET28c(+)-aiiTS	pET28c(+) containing <i>aiiTS</i> gene from <i>T. soleae</i> CECT 7292 ^T	This study
pGEM-T easy-aiiA	pGEM-T easy containing <i>aiiA</i> gene from uncultured <i>Bacillus</i> sp.	This study

^a Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain)^b American Type Culture Collection^c National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (Aberdeen, UK)

milliliters of 24-h cultures of *Tenacibaculum* sp. strains in MB were centrifuged at 2000×g for 5 min. Supernatants were then collected, acidified to pH 6.7, and filter-sterilized (0.20 μm) prior to use. Simultaneously, pellets were washed with phosphate buffered saline (PBS) pH 6.7 and resuspended in another 5 mL of the same buffer. Part of these cell suspensions were then used for live cells AHL degradation assays, in which aliquots of 250 μL were mixed with C6 or C10-HSL (10 μM) and incubated for 3 h at 22 °C with shaking. The remaining *Tenacibaculum* cell suspensions in PBS were

disrupted by sonication on ice to obtain the crude cell extracts (CCE) that were assayed either directly or after pasteurization at 60 °C for 2 h. As for live cell assays, serial dilutions of CCEs obtained in this way and culture supernatants (250 μL) were mixed with 10 μM of each AHL and incubated for 3 h at 22 °C with shaking. In order to detect AHL inactivation activity, 100 μL of the reaction mixtures was spotted in wells made in LB plates overlaid with 5 mL of a 1/100 dilution of an overnight culture of *C. violaceum* CV026 or VIR07 in soft LB (0.8 % agar). For live cell activity assays, the reaction

mixtures were centrifuged and only the supernatants were tested in the bioassay. Plates were incubated for 24 h at 30 °C, and the production of violacein was examined. PBS buffer plus the same amount of each AHL was used as control in all plates. Protein in the CCEs was measured by the Lowry method (modified from Lowry et al. 1951), and the minimum active concentration (MAC) of CCEs was established as the protein concentration in the highest decimal dilution being able to completely removed the AHLs in 3 h.

Aii20J homologous identification in genus *Tenacibaculum*

The genomic DNA from *Tenacibaculum* strains was used as template for PCR detection of Aii20J homologous. Genomic DNA was extracted with Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Primers Lact20JF (5'-GATTAACCATGGTAAAAAATATTTTTATTAGC-3') and Lact20JR (5'-GCTATGAATTCAACTTTTTTAATAGATTTTGTAAT-3') were used for all strains except for AiiTG for which primers Lact20JF and LactTG2R (5'-GCTATGTCGACCTTTTTAATAGATTTTGTAAT-3') were used to avoid the presence of an *EcoRI* restriction site. PCR conditions included denaturation at 94 °C, 5 min; 30 cycles of 94 °C, 45 s; 55 °C, 45 s; and 72 °C, 45 s, with a final extension for 10 min. PCR products (about 850 bp) were then sequenced, and a phylogenetic tree of Aii20J homologous was built by the neighbor-joining method using the MEGA 6 phylogenetic tool software package (Tamura et al. 2013) using the default parameters. SignalP 4.1 software was used to predict the signal peptide in the Aii20J sequence and glycosylation prediction was performed by NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Expression and purification of AHL-lactonases

The PCR products from *Tenacibaculum* sp. strain 20J (Aii20J) and homologous from *Tenacibaculum maritimum* NCMBI 2154^T (AiiTM) were purified, digested with *EcoRI* and *NcoI* (Thermo Scientific), and cloned into the *EcoRI* and *NcoI* sites of vector pET28c(+) using T4DNA ligase (Thermo Scientific), to introduce six histidine residues in the C terminus of the protein, and transformed by electroporation into *E. coli* BL21(DE3) plysS. AiiA (accession number CAD44268.1) from *Bacillus* sp. was also cloned to compare the activity of the AHL-lactonase from *Tenacibaculum* with AiiA from *Bacillus* sp. using primer aiiAFWD (5'-GATTAA CCATGGTAACAGTAAAGAAGCTTTATTTCG-3') and aiiARev (5'-GCTATGAATTCTTTATATATTCAGGGAACA CTTTAC-3'). The *E. coli* BL21(DE3) plysS strains expressing recombinant proteins were inoculated into fresh LB medium with kanamycin (25 µg/mL) at 37 °C with shaking. After the OD₆₀₀ of the culture reached 0.6, the protein expression was induced by the addition of isopropyl-D-

thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.1 mM followed by further incubation for 5 h. After incubation, cells were harvested by centrifugation, resuspended with 20 mL of PBS buffer, lysed by sonication on ice, and centrifuged at 4 °C (2000×g for 5 min). Due to the formation of inclusion bodies, pellets were washed two times in PBS buffer supplemented with 1 % Triton X-100 and six his-lactonases were purified using the His GraviTrap™ affinity column (GE Healthcare) protein purification kit under denaturing conditions by adding 6 M urea. Recombinant proteins were then refolded by dialysis in PBS with progressively decreasing concentrations of urea. For comparison, the enzyme was also dialyzed in autoclaved diluted marine water (10 ‰ salinity) in order to check the effect of the presence of metallic ions on the refolding of the enzyme. Purified proteins were measured by a UV-Vis Spectrophotometer Q5000 (Quawell) and then stored with an equivalent amount of pure glycerol at -80 °C and analyzed with 12 % SDS-PAGE.

Aii20J characterization

Thermal resistance of recombinant Aii20J in CCEs from *E. coli* BL21(DE3) plysS was evaluated with *C. violaceum*-based assays. CCE at a total protein concentration of 46.8 µg/mL (10 times higher than the minimal amount of CCE necessary to completely hydrolyze 10 µM of AHL in 3 h) was heat-treated at 22, 60, 80, and 100 °C for 10 min in thermoblock. After heat treatment, CCEs were mixed with C6-HSL 10 µM at 22 °C for 3 h and the remaining signal was detected in solid plate assay with *C. violaceum* CV026 as explained before.

Activity of purified recombinant Aii20J after heat treatment was also quantified by HPLC-MS. Aii20J (20 µg/mL, 10xMAC) was mixed with C6-HSL 50 µM in PBS pH 6.7. Two hundred-microliter aliquots were then taken at different times (0, 30, and 90 min) in triplicate, extracted three times with an equal volume of ethyl acetate; the solvent was evaporated under nitrogen flux and resuspended in 400 µL of acetonitrile for HPLC-MS analysis and quantification of remaining C6-HSL. Controls of PBS with the same amount of AHL were processed and extracted in the same way.

AHL degradation specificity of purified Aii20J (20 µg/mL) was evaluated with synthetic signals: *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL), C6-HSL, *N*-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL), C10-HSL, *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone (C12-HSL), *N*-tetradecanoyl-L-homoserine lactone (C14-HSL), *N*-oxohexanoyl-L-homoserine lactone (OC6-HSL), and *N*-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (OC12-HSL) at 10 µM in PBS. After 1 h of exposure, AHLs were extracted and processed as explained before for HPLC-MS analysis and quantification.

In order to determinate the kinetics of AHL degradation by Aii20J, C6- and C10-HSLs (50 µM) were added to a PBS solution buffer with purified Aii20J (20 µg/mL). At different

times (0, 10, 20, 30, 60, and 90 min), 200 μL of each solution was extracted three times with an equal volume of ethyl acetate, evaporated under flux of nitrogen and resuspended in acetonitrile for HPLC-MS analysis and quantification. C6- and C10-HSL degradation kinetics of purified AiiA (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from *Bacillus* sp. were evaluated at 0, 30, and 90 min. All experiments were performed in triplicate and PBS plus AHLs extracted at the same times were used as controls.

Effect of pH on Aii20J AHL-lactonase activity

To study the stability of Aii20J at various pH values, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the purified enzyme were incubated in different buffers with pH values that ranged from 3.0 to 9.0 for 30 min at 22 °C. Then pH was adjusted to 6.7, and C6- and C10-HSL signals were added at a final concentration of 10 μM and incubated for 3 h at 22 °C. Aliquots of 100 μL of each reaction were used to detect the residual AHL activity with the *C. violaceum* biosensors. The buffers used were McIlvaine buffer (pH 3.0 to 5.0), PBS buffer (pH 6.0 and 7.0), and 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0 and 9.0). PBS plus each AHL was used as negative control.

Resistance of Aii20J to proteases

To determine the resistance to proteolysis, the purified Aii210J was incubated at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with α -chymotrypsin (1:60 *w/wt*) and proteinase K (1:10 *w/wt*) (Cao et al. 2012) for 30 and 60 min at 30 °C. Then, C6- and C10-HSLs were added at 10 μM , and AHL detection solid bioassays were carried out after 24 h of exposure. PBS and proteases supplemented with the same amount of AHLs were set as negative controls.

Interference of Aii20J with antibiotics

To check the effect of purified Aii20J on different β -lactam antibiotics (penicillin G, methicillin, amoxicillin, ampicillin, cephalothin, cefaclor, cefoxitin, ceftriaxone, cefoperazone, imipenem, and meropenem) and its susceptibility to β -lactam inhibitors (sulbactam and postassium clavulanate), a solution of enzyme (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was incubated in duplicate with each antibiotic or β -lactam inhibitor in PBS buffer at 22 °C for 24 h, with constant agitation. Methicillin, amoxicillin, ampicillin, imipenem and meropenem were used at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, penicillin G at 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the rest of antibiotics and β -lactam inhibitors were used at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The remaining antibiotic activity after exposure to the enzyme was evaluated in comparison with controls maintained in PBS by antibiogram assay in Mullier-Hinton Agar plates with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *E. coli* XL1blue. Wells were made in each plate in which each reaction solution was added to compare with the antibiotics

and inhibitors without the enzyme. Plates were incubated 24 h at 37 °C to observe the results. As control, Aii20J at the same concentration in PBS pH 6.7 was added to the antibiograms. Moreover, an antibiogram with *Tenacibaculum* strain 20J was performed to detect possible resistances to antibiotics and β -lactam inhibitors tested.

Quenching acid resistance in *E. coli* K-12

Cultures of *E. coli* K-12 were grown in LB broth at 30 °C for 48 h with shaking. Then, cells were inoculated in LB broth with glucose (0.4 %) to repress the AR-1 acid resistance system (Dyszal et al. 2010), and incubated at 30 °C with or without 5 μM OC6-HSL, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aii20J. After 15 h of incubation cultures were diluted (1:1000) in MEM medium supplemented with glucose (0.4 %) and glutamate (1.6 mM) at pH 2.0 (Vogel and Bonner 1956) and incubated in the same conditions. Colony forming colonies units were estimated by plating dilutions in LB at 0, 1.5 and 3 h.

Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequences of the genes from *Tenacibaculum* strains have been deposited in GenBank database under the following accession numbers: KR232934 (*aai20J* gene from *Tenacibaculum* sp. 20J CECT 7426), KR232935 (*aaiTD* from *T. discolor* DSM 18842^T), KR232936 (*aaiTG* from *Tenacibaculum gallaicum* CECT 7122^T), KR232937 (*aaiTS* from *Tenacibaculum soleae* CECT 7292^T), KR232938 (*aaiTM* from *T. maritimum* NCMBI 2154^T), KR232939 (*aaiTL* from *Tenacibaculum lutimaris* DSM 16505^T), and KR232940 (*aaiTA* from *Tenacibaculum aestuarii* JCM 13491^T).

Results

Identification and cloning of the gene responsible for QQ activity in *Tenacibaculum* sp. 20J

The analysis of the QQ activity present in a purified cell extract of strain 20J separated by non-denaturing gel electrophoresis and covered with the biosensor strain CV026 and C6-HSL (20 μM) revealed a single degradation spot (data not shown), consistent with the presence of a single QQ enzyme in this bacterium (Tang et al. 2015). Different attempts were carried out for the identification of the gene responsible for AHL degradation in strain 20J. PCR amplification trials using degenerated primers designed on the basis of conserved sequences of QQ enzymes were unsuccessful. Also, the QSIS pMH655 plasmid (Rasmussen et al. 2005) was used to construct a genomic library of strain 20J that was expressed in *P. aeruginosa* PAOI in order to select the clones being able to survive in the presence of sucrose, which should carry the

gene responsible for AHL degradation, but no positive clone could be obtained. Finally, a fosmid genomic library of strain 20J was constructed in pCC2FOS (Epicentre) and used to transform EPI300™ *E. coli* cells. A functional screening on 96-well microtiter plates was carried out with *C. violaceum* biosensor CV026 (modified from Romero et al. 2010) on 6912 clones, and a single positive clone, named 13-E2, was obtained capable of inhibiting violacein production triggered by exogenous addition of C6-HSL (Fig. 1a). The enzymatic activity of the cell extract of clone 13-E2 against both C6- and C10-HSLs was confirmed by HPLC-MS, resembling the activity described for strain 20J live cells (Romero et al. 2011a). The acidification of the reaction mixture to pH 2 that drives spontaneous reformation of the lactone ring opened by lactonase activity allowed the partial recovery of the AHL (Fig. 1b). The partial recovery of restoration of AHLs after acidification has been reported previously for other lactonases

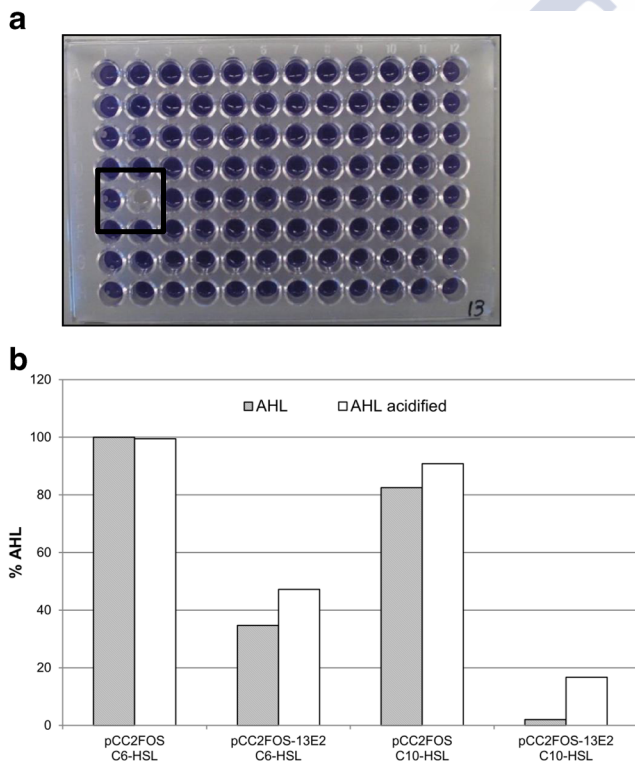


Fig. 1 Identification of the gene responsible for the QQ activity in *Tenacibaculum* sp. strain 20J. **a** Screening of a fosmid-based expression genomic library of *Tenacibaculum* sp. strain 20J constructed in pCC2FOS transformed in EPI300™ *E. coli*, in 96-well microtiter plates showing the only positive clone (13-E2) identified which is boxed. The screening was performed with *C. violaceum* CV026 biosensor. The presence of QQ activity is revealed by the absence of violacein in the well as a result of the degradation of exogenous C6-HSL (60 μM). **b** HPLC-MS analysis of degradation of C6-HSL and C10-HSL (10 μM) after 24 h by the crude cellular extract (CCE) of the positive clone 13-E2, identified in the pCC2FOS fosmid genomic library of strain 20J. Portions of the reaction mixtures were acidified to pH 2 to allow the recovery of the lactone ring after lactonolysis. EPI300™ *E. coli* extract with pCC2FOS fosmid without the insert and PBS were used as negative controls. Data are shown as percentage of the concentration retrieved in PBS treated in the same way

and has been attributed to additional degradation or modification of the ring-opened AHL (Rashid et al. 2011).

The insert in the positive clone 13-E2 (40 kb) was pyrosequenced using GS-FLX Titanium Plus sequencer technology (Roche) and simultaneously fragmented to perform a pBlue Script KS II (+)-based sub-library with smaller insert sizes (3–5 kb). A second functional screening was carried out with biosensors CV026 and VIR07 on the clones obtained in the sub-library in order to unequivocally identify the gene responsible for the enzymatic activity present in clone 13-E2. As a result, an ORF of 861 bp was identified in all sequenced fragments that encoded a putative metallo-β-lactamase of 286 amino acid residues that was named *autoinducer inactivator* gene from *Tenacibaculum* sp. 20J (*aii20J*) confirming the results obtained from the HPLC analysis of the QQ activity in the positive clone. The complete sequence of the 40-kb fragment present in clone 13-E2 confirmed that the active sequence was located on the 3' end of the insert. A zinc-binding domain (HXHXDH) that is commonly conserved in the metallo-β-lactamase superfamily was detected in the amino acid sequence of *aii20J* (Fig. 2), as well as other histidine and aspartic acid residues (Bebrone 2007; Dong et al. 2000; Dong et al. 2002), which confirms the data derived from biochemical analysis regarding the presence of a lactonase in strain 20J, and was classified as a new member of metallo-β-lactamase superfamily (Figs. 2 and 8). Although a putative Gram-positive signal peptide was predicted at the N terminus in the amino acid sequence of Aii20J by SignalP 4.1 analysis (Fig. 2), Aii20J is not excreted, since no QQ activity could be detected in the culture medium of strain 20J (Romero et al. 2014) or in any of the *Tenacibaculum* strains studied (see below).

QQ activity and presence of Aii20J homologous in the genus *Tenacibaculum*

The presence of QQ activity was investigated in cultures of another seven strains of the genus *Tenacibaculum* by C6- and C10-HSL degradation bioassay with *C. violaceum* biosensors. Most strains were able to degrade C6- and C10-HSL signals after 3 h of exposure (Fig. 3), showing a degradation activity in live cells similar to that of strain 20J (Romero et al. 2014). On the contrary, *Tenacibaculum aestuarii* JCM 13491^T and *T. lutimaris* DSM 16505^T could only degrade the long-chain signal C10-HSL under the same conditions. The activity was also present in cell extracts in all cases. On the contrary, the two strains of *T. maritimum* tested, *T. maritimum* CECT 4276 and NCIMB 2154^T, failed to degrade both C6- and C10-HSL signals, a result that contrasts with previous reports that found C10-HSL degradation activity in *T. maritimum* NCIMB 2154^T (Romero et al. 2010). This discrepancy may be derived from the strict control of pH in the present experiments in which the pH was maintained at pH 6.7 to discard a

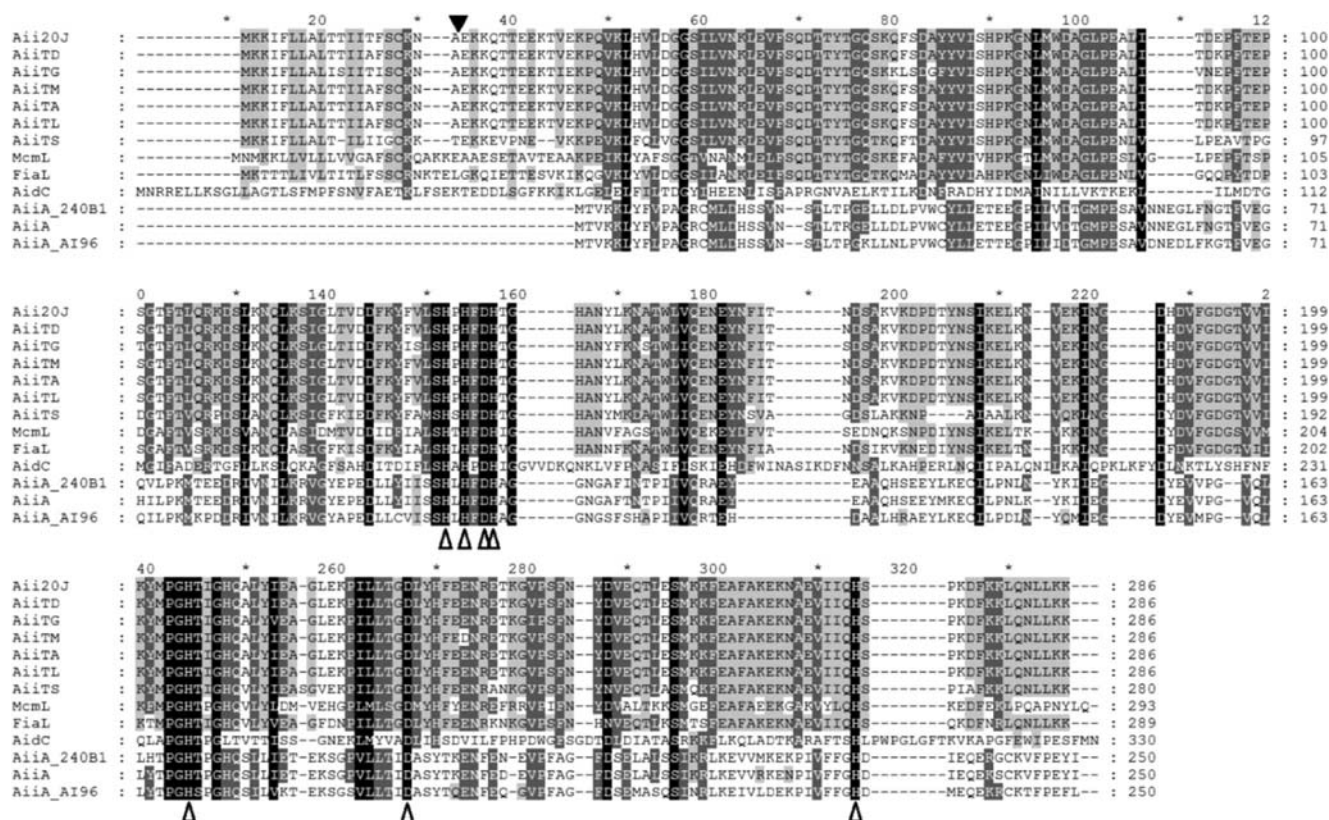


Fig. 2 Amino acid sequence alignment of AHL-lactonases from *Tenacibaculum* and *Bacillus*. Aii20J: Aii20J sequence from strain 20J; AiiTD: sequence from *T. discolor* DSM 18842^T; AiiTL: sequence from *T. lutimaris* DSM 16505^T; AiiTA: sequence from *T. aestuarii* JCM 13491^T; AiiTM: sequence from *T. maritimum* NCIMB 2154^T; AiiTG: sequence from *T. gallaicum* CECT 7122^T; AiiTS: sequence from *T. soleae* CECT 7292^T; AiiA(240B1): AiiA sequence from *Bacillus* sp. strain 240B1 (accession number AAF62398.1); AiiA: AiiA sequence from an uncultured *Bacillus* sp. (CAD44268.1), AI96:

AiiA from *Bacillus* sp. strain AI96 (ADK91097.1), AidC from *Chryseobacterium* sp. strain StRB126 (BAM28988.1), MomL from *Muricauda olearia* (AIY30473), and FiaL from *Flaviramulus ichthyenteri* Th78^T (WP_034041734.1). Sequences were aligned using ClustalW program (Thompson et al., 1994) and shaded with the Genedoc program (<http://www.nrbc.org/gfx/genedoc/>). The identical and similar residues are shaded in black and grey, respectively. The conserved metal binding residues are indicated by white triangles. Predicted cutting site for putative signal peptide is shown by a black triangle

spontaneously degradation of AHLs caused by alkaline pHs (Yates et al. 2002). No QQ activity was retrieved in the cell-free culture media of any of the *Tenacibaculum* strains (data not shown), revealing that as described for strain 20J, their QQ activity against C6- and C10-HSLs is cell-bound.

To investigate the presence of sequences homologous to Aii20J in other strains of the genus *Tenacibaculum*, PCR amplification was performed using primers Lact20JF and Lact20JR or LactTG2R and the genome of *Tenacibaculum aestuarii* JCM 13491^T, *T. discolor* DSM 18842^T, *T. gallaicum* CECT 7122^T, *T. soleae* CECT 7292^T, *T. lutimaris* DSM 16505^T, and *T. maritimum* NCIMB 2154^T as template. Results showed that all the *Tenacibaculum* species studied have an AHL-lactonase that shares an identity of 99 % with Aii20J sequence at amino acid level, except AiiTG from *T. gallaicum*, that shares an identity of 93 % and AiiTS from *T. soleae*, that shares an identity of 76 % with Aii20J and clusters together with the homologous sequence found in the genome of *T. ovolyticum* (Fig. 2), in which the AHL-

degrading activity remains to be confirmed. All sequences shared the same signal sequence with the same predicted cleavage site, although no QQ activity was found in the culture media of any of the strains. Despite showing no AHL degradation activity in bioassays (Fig. 3), *T. maritimum* NCIMB 2154^T harbors a lactonase, AiiTM, that is 99 % identical to Aii20J at the amino acid level (Fig. 2). Interestingly, the lactonase from *T. maritimum* was able to hydrolyze AHLs when transformed into *E. coli*, while live cells or culture medium from *T. maritimum* showed no AHL degradation activity (data not shown).

Overexpression and purification of Aii20J

aii20J was amplified by PCR with primers Lact20JF and Lact20JR using genomic DNA of 20J as template. The amplification product was digested with *Nco*I and *Eco*RI and ligated into the overexpression plasmid pET28c(+) linearized with the same restriction enzymes. Since pET28c(+) adds an hexa-

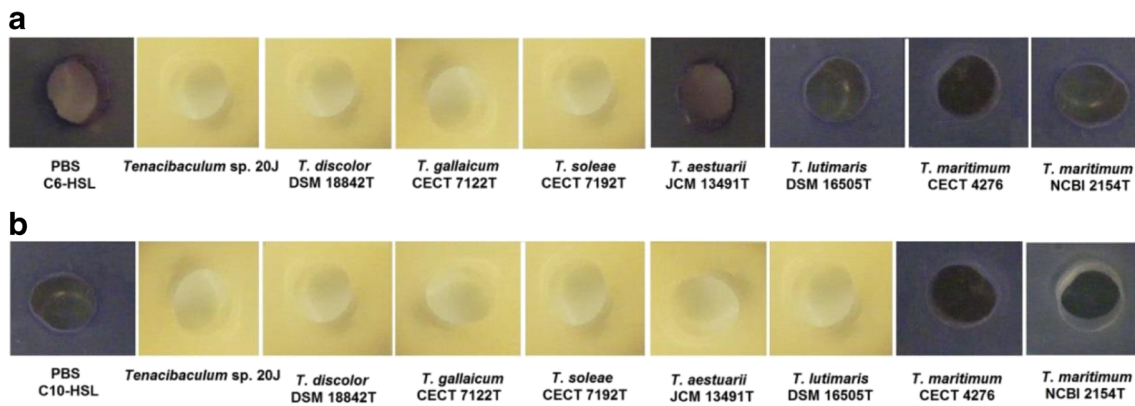


Fig. 3 Solid plate assay to detect AHL-QQ activity in live cells of different *Tenacibaculum* strains with the AHL biosensors *C. violaceum* CV026 (a) and *C. violaceum* VIR07 (b) in cultures of *Tenacibaculum aestuarii* JCM 13491^T, *T. discolor* DSM 18842^T, *T. gallaicum* CECT 7122^T, *T. soleae* CECT 7292^T, *T. lutimaris* DSM 16505^T, *T. maritimum*

CECT 4276, and *T. maritimum* NCIMB 2154^T. Remaining AHL activity was evaluated after 3 h of exposure of C6- or C10-HSLs 10 μ M in PBS pH 6.7 to live cells. A positive control was also set in the plates with strain *Tenacibaculum* sp. 20J

histidine tail to the recombinant protein, Aii20J could be purified after overexpression in *E. coli* BL21(DE3) plysS. For comparison, AiiA from *Bacillus* sp. (Carlier et al. 2003; accession number CAD44268.1) was also cloned and overexpressed in the same way. When overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) plysS, Aii20J and AiiA formed inclusion bodies under the tested conditions, and therefore, urea denaturation followed by refolding by dialysis in PBS buffer 6.5 pH was needed in order to purify these lactonases. Interestingly, when the signal peptide sequence was removed from the sequence, no inclusion bodies were formed and the resulting truncated Aii20J was retrieved in the soluble fraction of cell extracts (Fig. 4a). A similar effect of the signal peptide has been already described for MomL (Tang et al. 2015). However, in order to facilitate the comparison with the *Bacillus* enzyme, the un-truncated form of Aii20J was used through the study. The SDS-PAGE analysis showed that purified Aii20J migrates as a single band with molecular mass slightly lower than 35 kDa, which is consistent with its predicted molecular mass of 34.9 kDa, including the histidine tag (Fig. 4b).

Characterization of Aii20J

Substrate specificity

The minimum active concentration (MAC) of purified Aii20J (complete sequence) was calculated as the minimal concentration of purified enzyme necessary to completely hydrolyze 10 μ M of C6-HSL in 3 h as detected by the *C. violaceum* solid plate assay (data not shown) and was established as 2 μ g/mL (the same amount for C10-HSL). Ten times this concentration (20 μ g/mL) was used in all the assays for the physical-chemical characterization of the enzyme. Under the same conditions, 100 μ g/mL of AiiA was necessary to completely

hydrolyze the same amount of C6-HSL and 40 μ g/mL of C10-HSL, indicating a higher specific activity of Aii20J.

The capacity of Aii20J to hydrolyze different unsubstituted (C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL) and substituted (OC6-HSL and OC12-HSL) AHLs after 1 h of exposition at 22 $^{\circ}$ C was measured by HPLC-MS analysis in triplicate. Results revealed a broad and unspecific substrate spectrum for purified Aii20J, since a concentration of enzyme of 20 μ g/mL was sufficient to completely degrade 10 μ M of all the tested signals in 1 h except for C4-HSL that was reduced by 60 % and OC6-HSL that was reduced by 80 % in the same period (data not shown). Aii20J was also able to eliminate the activity of OC10-HSL, OHC10-HSL, OC12-HSL, OHC12-HSL, OC13-HSL, and OC14-HSL as detected by *C. violaceum* bioassays (data not shown).

AHL degradation kinetics

The degradation kinetics of purified Aii20J (20 μ g/mL) and AiiA (40 μ g/mL) against C6-HSL and C10-HSL were investigated by sampling the mixture reactions at different times, extracting and quantifying the AHLs by HPLC-MS. C10-HSL was completely eliminated by purified Aii20J after 20 min (Fig. 5), while less than 40 % of the initial amount of C10-HSL had been degraded by AiiA after 30 min. It should be noted that the amount of AHL used for the degradation kinetics is at least one order of magnitude higher than the concentration usually found in bacterial cultures (Romero et al. 2014). Results also showed a preference of Aii20J for long AHL signals as the short signal C6-HSL was completely degraded only after 60 min. In comparison, AiiA was able to reduce C6-HSL and C10-HSL by 50 and 60 %, respectively, after 90 min of exposure (Fig. 5). On the basis of these results, the specific activity of purified Aii20J, defined as the hydrolyzed micromoles of AHL per minute per milligram of AHL-

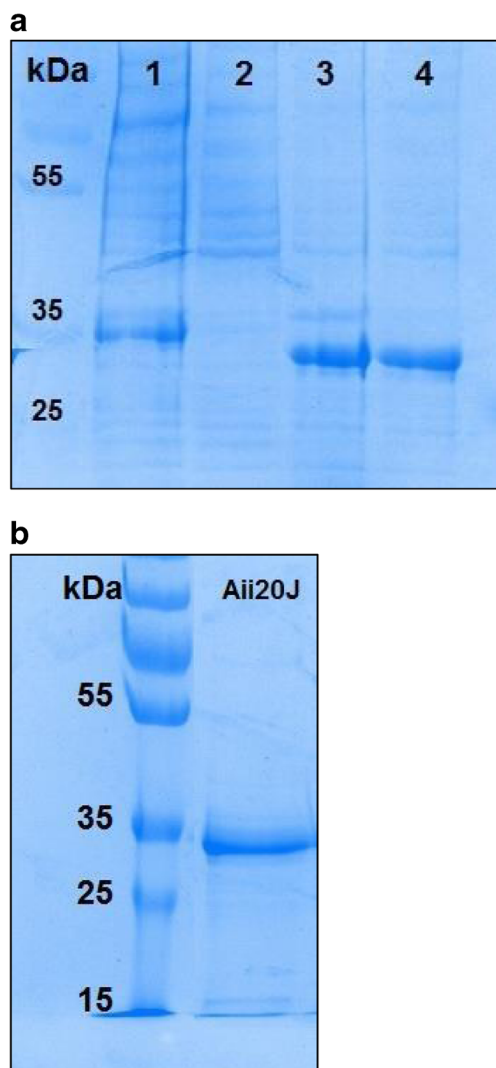


Fig. 4 **a** SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue of cell extracts of *E. coli* BL21(DE3) *plysS* transformed with pET28c(+) harboring the full sequence of *aii20J* (lanes 1 and 2) and with the sequence without the signal peptide (lanes 3 and 4). Lanes 1 and 3 show non-centrifuged extracts. Lanes 2 and 4 show centrifuged extracts. **b** SDS-PAGE gel of the purified lactonase Aii20J (full sequence, right lane). Left lane, protein marker. The protein, including the poly-his tag and the signal peptide, has an expected molecular weight of 34.9 kDa

lactonase was 142 U/mg towards C6-HSL and 230 U/mg towards C10-HSL, while the specific activity of AiiA was 16 U/mg towards C6-HSL and 21 U/mg towards C10-HSL, which are similar to the specific activity values reported in the literature for AiiA from *Bacillus* sp. 240 (Wang et al. 2004).

Response to physical-chemical conditions: thermostability, resistance to pH changes and proteases

Resembling the thermostability of the QQ activity present in the CCEs of strain 20J, the enzymatic activity present in crude cell extracts (CCE) of *E. coli* BL21(DE3) *plysS* transformed

with pET28c(+)-*aii20J* was extremely thermostable, being able to resist a treatment of 100 °C during 10 min even if the extract had been previously pasteurized for 2 h at 60 °C (Fig. 6a).

On the contrary, the purified enzyme Aii20J showed significant lower thermo resistance, being able to resist a treatment of 80 °C for 10 min (data not shown). Activity was still present in the purified enzyme after a treatment at 60 °C during 10 min but was significantly reduced in comparison with the untreated enzyme (Fig. 6b). When the denaturized, purified enzyme was refolded in sterilized seawater instead of PBS; the enzyme thermostability increased from 60 to 80 °C (data not shown).

To establish the feasibility of Aii20J as an animal feed additive that has to be ingested orally, we also assessed how the exposure during 30 min to different pHs in the range 3–9 affected the catalytic activity of Aii20J against C6- and C10-HSLs. Aii20J was fully active against both AHLs after exposure to all the pH range tested (data not shown).

The resistance of purified Aii20J (20 µg/mL) to α -chymotrypsin and proteinase K was also tested and evaluated with the biosensors *C. violaceum* CV026 and VIR07 to detect AHL degradation of C6- and C10-HSLs. Aii20J was strongly resistant to both proteases, being able to degrade the signals after 30- and 60-min incubation with proteases (data not shown).

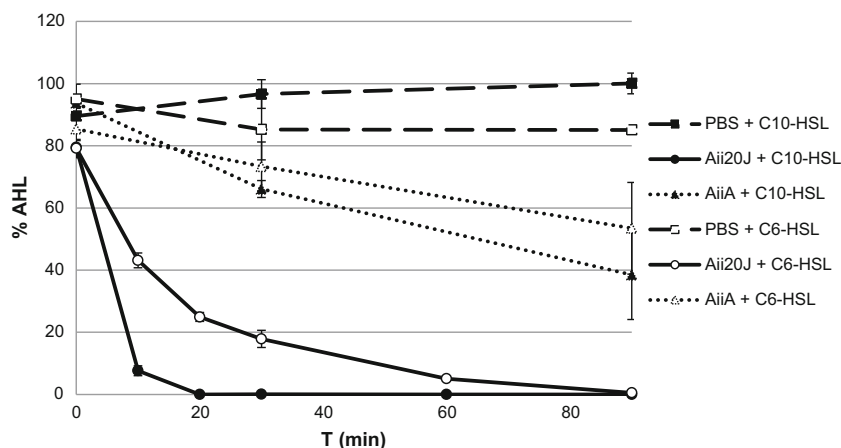
Interference with β -lactam antibiotics

Due to the sequence similarity of Aii20J and other AHL-lactonases with β -lactamases, which are responsible for the antibiotic resistance of numerous bacteria (Bebrone 2007), the activity of Aii20J against different β -lactam antibiotics including penicillin G, methicillin, amoxicillin, ampicillin, cephalothin, cefaclor, cefoxitin, ceftriaxone, cefoperazone, imipenem, and meropenem was evaluated. Moreover, Aii20J susceptibility to β -lactamase inhibitors like sulbactam and postassium clavulanate was studied. Each antibiotic was incubated with a solution of Aii20J (20 µg/mL) for 24 h and residual activity was evaluated against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *E. coli*. No changes in the activity of antibiotics treated with Aii20J lactonase were observed (data not shown). Moreover, AHL degradation activity of Aii20J was not affected by the β -lactam inhibitors tested (data not shown). In addition, strain 20J showed no resistance to the same antibiotics.

Quenching acid resistance in E. coli K-12

In order to check whether the lactonase Aii20J could revert the protective effect of AHLs on *E. coli* K-12 when exposed to low pH, an acid resistance assay was performed. The addition of 5 µM OC6-HSL or C6-HSL resulted in a 2- to 50-fold increase in acid resistance in

Fig. 5 Kinetics of degradation of C6-HSL and C10-HSL (50 μ M) by purified Aii20J (20 μ g/mL) from *Tenacibaculum* sp. 20J and purified AiiA (40 μ g/mL) from *Bacillus* sp. (Carrier et al. 2003) by HPLC-MS. Controls were set with the signals in PBS. Data are means \pm SD of three independent degradation reactions. AHL concentrations were measured by HPLC-MS using external calibration curves



E. coli in different experiments (Fig. 7, data shown for OC6-HSL activation). The addition of Aii20J (20 μ g/mL) to cultures without signal had no significant effect on *E. coli* resistance to acidic environment while the

addition of Aii20J to cultures to which AHL was added resulted in a significant reduction (around 50 %) in cell viability in comparison with cultures that were acid-resistant due to the presence of AHLs (Fig. 7).

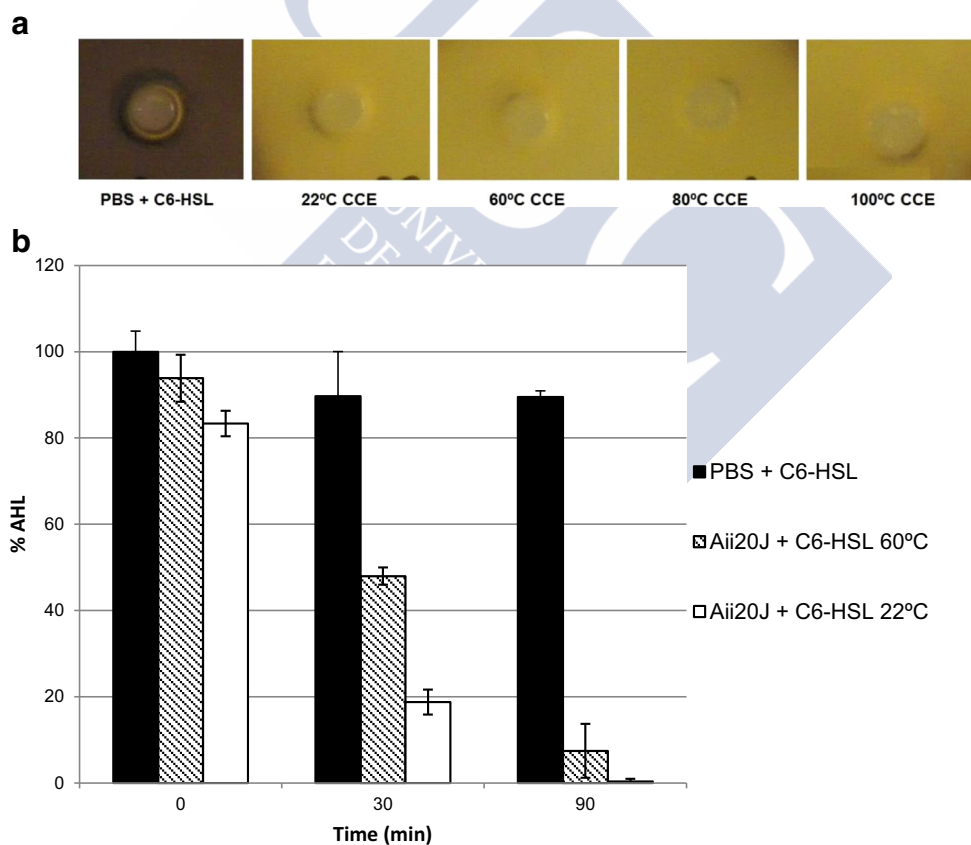


Fig. 6 **a** Thermostability of pasteurized (60 $^{\circ}$ C, 2 h) CCE from *E. coli* BL21(DE3) plysS transformed with pET28c(+)-aii20J, heat treated at 22, 60, 80, and 100 $^{\circ}$ C for 10 min. Solid plate assay was performed with 10 μ M C6-HSL and detected by biosensor *C. violaceum* CV026 after 3 h of exposure. PBS plus the same amount of C6-HSL was used as negative control. **b** Thermostability of purified Aii20J (20 μ g/mL) from *Tenacibaculum* sp. 20J treated previously at 60 $^{\circ}$ C for 10 min.

Remaining C6-HSL after 90 min concentration was measured by HPLC-MS. PBS with the same amount of C6-HSL (50 μ M) was set as control. Data are means \pm SD of three independent degradation reactions. Differences in the thermo resistance of cell extracts and purified enzyme are derived from the denaturation process applied to solubilize the inclusion bodies, since the soluble enzyme showed the same thermostability profile than CCEs (data not shown)

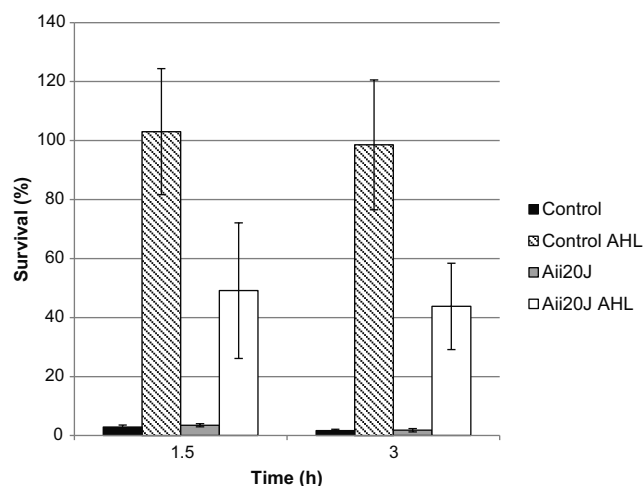


Fig. 7 Effect of the quorum-quenching lactonase Aii20J on AHL-induced acid resistance of *E. coli* K-12. Cells were grown in LB glucose with 5 μ M OC6-HSL (Control AHL), with Aii20J (20 μ g/mL) (Aii20J), with Aii20J and OC6-HSL (Aii20J AHL) or *E. coli* K-12 alone (Control) at 30 $^{\circ}$ C and then subcultured into pre-warmed MEM with glucose and glutamate at pH 2.0 at the same temperature. *E. coli* survival was determined by plating for CFU/mL at 0, 1.5, and 3 h and was expressed as percent in regard to viable cell counts at 0 h. Each condition was assayed in triplicate and error bars represent standard deviation

Discussion

The enzyme responsible for the quorum-quenching activity in *Tenacibaculum* sp. 20J, Aii20J, shares only 26–31 % identity at the amino acid level across the entire length of AiiA from different species of *Bacillus* (Cao et al. 2012; Carrier et al. 2003; Dong et al. 2000), by BLAST analysis (Fig. 2). The identity shared with other AHL-lactonases belonging to the metallo- β -lactamases superfamily is in some cases even lower, including 31 % with AttM from *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang et al. 2002), 26 % with AhlK from *Klebsiella pneumoniae* (Park et al. 2003), 24 % with AhlS from *Solibacillus silvestris* (Morohoshi et al. 2012), 23 % with AhlD from *Arthrobacter* sp. (Park et al. 2003), and the thermostable AiiT from *Thermaerobacter marianiensis* (Morohoshi et al. 2014). Recently, three different lactonases have been identified in bacteria belonging to the *Bacteroidetes* phylum that includes the genus *Tenacibaculum*; Aii20J shares 28 % identity at amino acid level with AidC from *Chryseobacterium* sp. strain StRB126 (Wang et al. 2012), 59 % with MomL from *Muricauda olearia* (Tang et al. 2015), and 71 % with FiaL (gene GL001211) from *Flaviramulus ichthyenteri* Th78^T (Zhang et al. 2015).

A sequence highly homologous to *aai20J* was found in all the strains of *Tenacibaculum* studied. All of them share an identity of 99 % with Aii20J sequence at amino acidic level, except for AiiTG from *T. gallaicum* that shares an identity of 93 % and AiiTS from *T. soleae* that shares an identity of 76 %

with Aii20J (Fig. 2). Despite the presence of the sequence in all the *Tenacibaculum* strains, differences were found in the QQ activity of live cells and cell extracts were observed, since two of them, *T. aestuarii* JCM 13491^T and *T. lutimaris* DSM 16505^T, could only degrade the long-chain signal C10-HSL. No significant difference was found in the sequence and/or conserved domains of these strains to justify the differences in degradation activity with the other strains, and therefore differences could be derived from differences in the level of expression of the lactonase among species. Despite the presence of a sequence 99 % identical to Aii20J, the two *T. maritimum* strains tested, *T. maritimum* CECT 4276 and NCIMB 2154^T, failed to degrade both C6- and C10-HSL signals. On the contrary, the enzyme was active when expressed in *E. coli*, indicating that the AiiTM lactonase-encoding gene could be regulated by an upstream region or promoter, which avoids gene expression, at least under the culture conditions tested, or produces a non-functional protein in the *T. maritimum* strains tested. This result has important implications for the evaluation of QQ activity in natural samples solely on the basis of the presence of QQ sequences (Romero et al. 2012).

All the *Tenacibaculum* AHL-lactonase sequences cluster together as a separate branch within the metallo- β -lactamases, being closely related to the other MBLs identified from species of the CFB cluster (Fig. 8), sharing the unique characteristic of the presence of a Gram-positive signal peptide. The presence of a signal peptide seems to be a unique characteristic of AHL-lactonases from the *Bacteroidetes* group, since a signal peptide with the same cutting site can also be predicted in the sequences of MomL, AidC, and FiaL (Fig. 2). Despite the existence of a predicted signal peptide and unlike MomL that is an extracellular enzyme (Tang et al. 2015), Aii20J is not excreted, since no QQ activity could be detected in the culture medium of strain 20J (Romero et al. 2014) or in any of the *Tenacibaculum* strains studied. Therefore, the presence of a signal peptide in Aii20J sequence and its homologous could represent a reminiscence indicating horizontal transfer of such activity.

The characterization of the QQ activity of Aii20J revealed a much higher specific activity than AiiA from *Bacillus* (Fig. 5). Only 2 μ g/mL of enzyme was necessary to hydrolyze 10 μ M of C6-HSL in 3 h as detected by the *C. violaceum* solid plate assay (data not shown) in comparison with the 100 μ g/mL of AiiA necessary to carry out the same reaction. Aii20J is characterized by a wide range of substrates, being able to degrade all the unsubstituted and substituted AHLs tested, with a slight preference for long-chain AHLs (Fig. 5). These results differ from profiles registered for AidC from *Chryseobacterium* sp., classified as a member of the CFB group, which shows slightly higher degradation activity against oxo-substituted AHLs than against unsubstituted AHLs and was more effective degrading C6- and C8-HSLs than C10- and C12-HSLs (Wang et al. 2012). Several studies

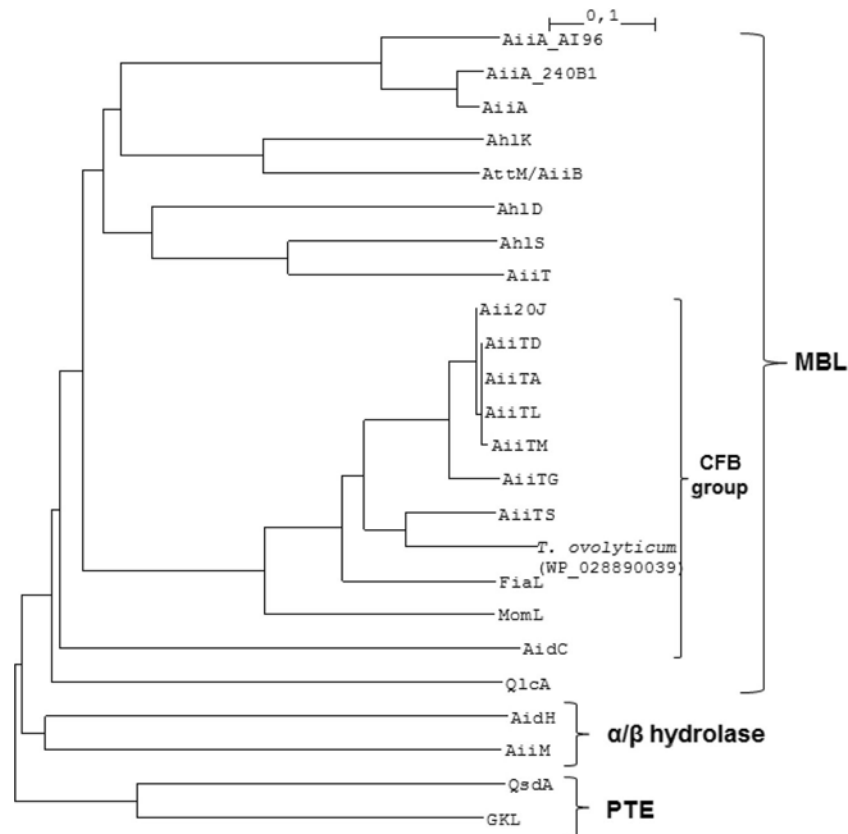


Fig. 8 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of the AHL-lactonases Aii20J, AiiTD, AiiTG, AiiTS, AiiTA, AiiTL, and AiiTM from *Tenacibaculum* spp. and the homologous sequence found in the genome of *T. ovolyticum* (accession number WP_028890039, Zhang et al. 2015), AhlD from *Arthrobacter* sp. (AAP57766.1, Park et al. 2003), AhlK from *K. pneumoniae* (AAO47340.1, Park et al. 2003), AhlS from *Solibacillus silvestris* (BAK54003.1, Morohoshi et al. 2012), AidC from *Chryseobacterium* sp. strain StRB126 (BAM28988.1, Wang et al. 2012), AidH from *Ochrobactrum* sp. T63 (ACZ73823.1, Mei et al. 2010), AiiA from *Bacillus* sp. strain 240B1 (AAF62398.1, Dong et al. 2000), AiiA from uncultured *Bacillus* sp. (CAD44268.1, Carlier et al. 2003), AiiA from *Bacillus* sp. strain AI96 (HM750248.1, Cao et al. 2012), AiiM from *Microbacterium testaceum* strain StlB037 (YP_

004225655.1, Morohoshi et al. 2011), AttM/AiiB from *A. tumefaciens* (AAL13075.1, Zhang et al. 2002), QlcA from *Acidobacteria bacterium cosmid p2H8* (ABV58973.1, Riaz et al. 2008), QsdA from *Rhodococcus erythropolis* (AAT06802.1, Uroz et al. 2008), AiiT from *Thermaerobacter marianensis* (AB935246.1, Morohoshi et al. 2014), FiaL from *Flaviramulus ichthyenteri* Th78^T (WP_034041734.1, Zhang et al. 2015), MomL from *Muricauda olearia* (AIY30473, Tang et al. 2015), and GKL from *Geobacillus kaustophilus* (WP_011231002.1, Chow et al. 2010). Sequences are divided as members of the metallo-β-lactamase family (MBL), α/β-hydrolase family and phosphotriesterase family (PTE). The dendrogram was constructed by the neighbor-joining method using ClustalW. The scale bar represents 0.1 substitutions per amino acid position

have demonstrated that AiiA from *Bacillus* also shows strong preference for long-chain AHLs (Liu et al. 2013; Momb et al. 2008). The AiiA enzyme used in this study for comparison (Carlier et al. 2003) also shows preference for C10-HSL. The strong ability of Aii20J to degrade all range of AHLs makes it one of the most active QQ enzymes described. It should be noted that in the present study, the pH conditions were always controlled to discard a spontaneous degradation of HSL ring of signals due to alkaline pH (Yates et al. 2002).

The thermo resistance of the QQ enzymes is a valuable characteristic that enables a wider range of biotechnological applications. When the complete sequence of Aii20J was overexpressed in *E. coli*, the protein formed inclusion bodies and urea denaturation was required for purification. The denaturation and refolding process strongly affected the thermo resistance of the enzyme. Residual enzymatic activity was

found in the purified, full sequence Aii20J after a treatment of 80 °C for 10 min, but only when reconstituted in the presence of metallic ions, which indicates that the presence of metal ions is beneficial for the correct folding and catalytic activity of the protein, as described previously for other metallohydrolases (Cao et al. 2012; Chen et al. 2010; Momb et al. 2008; Tang et al. 2015; Wang et al. 2012) and confirms that correct folding is a key factor in the thermostability of the denatured enzyme. Activity was still present in the purified enzyme after a treatment at 60 °C during 10 min but was significantly reduced in comparison with the untreated enzyme (Fig. 6b). No potential *N*-glycosylation site was identified by NetCGlyc 1.0 Server, which is a characteristic related to thermo resistance of enzymes (Chen et al. 2010), and therefore the loss of thermo resistance of the purified enzyme cannot be associated with improper glycosylation in the

overexpression strain. When the signal peptide is eliminated from the sequence, the enzyme is produced as a soluble protein in *E. coli* and no denaturalization is necessary for purification. The native, truncated Aii20J was able to resist a treatment of 100 °C for 10 min without significant reduction in the activity, presenting a much higher thermostable profile than the closely related lactonase MomL that retained 30 % activity after being heated to 60 °C for 30 min (Tang et al. 2015) and indicating that the presence of the signal peptide is not involved in the extremely high thermostability of the enzyme. Nevertheless, even after denaturation and refolding, the thermostability of reconstituted Aii20J was significantly higher than that of AiiA from *Bacillus* sp. 240 which is inactive at >45 °C (Wang et al. 2004) or than AidC from *Chryseobacterium* sp. which reduces its relative activity after incubation at temperatures over 50 °C and its enzymatic activity is greatly reduced over 60 °C (Wang et al. 2012). In the case of the thermostable AiiA_{A196} from *Bacillus* sp. strain A196, it has been described that it retains 20 % of its activity at 60 °C (Cao et al. 2012) similarly to denatured Aii20J (Fig. 6b); nevertheless, the thermostability profile of AiiA_{A196} was examined at pH 8.0 and therefore the AHLs could be degraded spontaneously (Yates et al. 2002). An increased number of proline or reduced number of glycine residues has been proposed as one of the factors sustaining a higher thermostability in phosphotriesterase-like lactonases (Hawwa et al. 2009). In the thermostable lactonase AiiT from *Thermaerobacter marianensis* that presents a maximal AHL-degrading activity at approximately 70–75 °C, corresponding to the optimal growth condition of the parent strain, the number of arginine and aspartate residues in the non-conserved domains increased in comparison with the closely related thermo-sensitive AhIS (Morohoshi et al. 2014), providing stabilization to the structure of the protein through the existence of ion pairs among oppositely charged residues. None of these two characteristics is present in Aii20J in comparison with the amino acidic sequence of the close thermo-sensitive AidC (Wang et al. 2012) or the thermostable MomL (Tang et al. 2015), and therefore, the thermostability found in Aii20J should be derived from different features.

The highly thermostable profile of Aii20J and the wide spectrum of substrates are important characteristics for the industrial application of this enzyme, guarantying its use under aggressive physical-chemical conditions such as feed fabrication. Another important characteristics of Aii20J are the resistance to proteinases and extreme pH values (3–9) in comparison with AiiA from *Bacillus* sp., which completely lost enzymatic activity at pHs lower than 5 (Wang et al. 2004). AidC from *Chryseobacterium* sp. (Wang et al. 2012) and the thermostable AiiA_{A196} lactonase were unstable at pHs lower than 6 (Cao et al. 2012). Also, the activity of MomL, from *Muricauda olearia*, was completely lost when incubated at pH lower than 7 (Tang et al. 2015), which confirms the unique

characteristics of Aii20J. These results suggest that this enzyme could be able to retain its activity after passing the digestive tract of animals, and therefore it would be possible to use it as a functional ingredient in feeds for the control of bacterial pathogens with AHL-based QS.

The family of metallo- β -lactamases includes broad-spectrum enzymes able to hydrolyze most clinically useful β -lactam antibiotics, including carbapenems (Bebrone 2007). Due to the sequence similarity of Aii20J and other AHL-lactonases with β -lactamases, which are responsible for the antibiotic resistance of numerous bacteria (Bebrone 2007), the activity of Aii20J against different β -lactam antibiotics was evaluated, confirming the absence of interference. AHLs have been proposed to have other different properties, functioning as iron quelants or antibiotics (Kaufman et al. 2005; Qazi et al. 2006; Romero et al. 2011b). Reversely, in a natural environment, antibiotics are often present in subinhibitory concentrations and therefore have been proposed to act like molecules involved in QS process and biofilm formation (Sengupta et al. 2013). The absence of activity of Aii20J towards a wide range of β -lactam antibiotics indicates that in this case, Aii20J lactonase is an enzyme with a well-defined action spectrum excluding antibiotics.

Acid resistance is an important virulence feature of gastrointestinal pathogens as *E. coli* (Lin et al. 1996), and *sdiA* has a key role in the regulation of the glutamate-dependent resistance acid system as well as controlling the production of other virulence factors in a QS-dependent manner in *E. coli* K-12 and EHEC (Dyszal et al. 2010; Kanamaru et al. 2000; Sharma and Bearson 2013). In our experiments, the addition of 5 μ M OC6-HSL or C6-HSL resulted in a 2- to 50-fold increase in acid resistance in *E. coli* (Fig. 7). These data are in deep contrast with those obtained by Dyszal et al. (2010) that reported no effect of 1 μ M OC6-HSL on acid resistance of either wild-type or SdiA mutants of *E. coli*, suggesting that a different signal molecule could be responsible for the activation of the glutamate-dependent acid-resistant system. This discrepancy can be derived from the higher amount of AHL used in the present experiments. The addition of Aii20J (20 μ g/mL) to cultures to which AHL was added resulted in a 50 % reduction in cell viability in comparison with cultures that were acid-resistant due to the presence of AHLs (Fig. 7). Therefore and even though Aii20J presents relatively low affinity towards OC6-HSL in comparison with non-substituted AHLs, the enzyme is able to counteract the effect of the signal on SdiA, even when such high concentration of AHL is used.

Although most of the experiments regarding the role of SdiA on the expression of virulence factors in *E. coli* have been carried out through the overexpression of the gene (Kanamaru et al. 2000; Rahmati et al. 2002; Van Houdt et al. 2006; Yamamoto et al. 2001) and therefore cannot be extrapolated to its role under natural conditions and signal specificity, several studies indicate that AHLs or AHL-like

molecules can interact with the SdiA system in *E. coli*, resulting in the modification of gene expression. When Shiga toxin- and verotoxin-producing *E. coli* were transformed with the *yenI* gene of *Yersinia enterocolitica* to produce AHLs, the transgenic strain showed impaired expression of flagella, decreased motility, reduced biofilm formation etc., as well as attenuated adherence and invasion of IPEC-12 cells (Yang et al. 2013). Also, organic extracts obtained from aerobic granules from membrane-partitioned bioreactors used for wastewater treatments promote adhesion and growth of *E. coli*, and such activity has been attributed to the presence of AHLs in the liquid phase of granular sludge (Ren et al. 2013). Present results clearly demonstrate that the presence of OC6-HSL strongly promotes the acid resistance mechanisms in *E. coli* K-12, and this effect can be partially quenched by the addition of the lactonase Aii20J. Aii20J was not able to completely restore the acid sensitivity of the cultures, which may indicate that a very little amount of AHL is necessary for the activation of SdiA or that another molecule produced by *E. coli* should be able to activate SdiA or another downstream regulator, promoting acid resistance. Recently, a new type of signal molecules, the dialkylresorcinols, has been identified being able to activate LuxR-type orphan receptors (Brameyer et al. 2015). This or another autoinductor could be responsible for the activation of SdiA receptor in *E. coli* in the absence of AHLs.

Our results confirm the potential of the use of Aii20J in the control of the expression of virulence and adaptation genes in important human pathogens, as demonstrated for acid resistance in *E. coli*. Unique features like extreme temperature and pH resistance, resistance to proteases, wide substratum spectrum, and high specific activity enable the application of this QQ enzyme in a wide range of biotechnological applications.

Acknowledgments Prof. Miguel Cámara from the University of Nottingham kindly provided the AiiA gene from *Bacillus* sp. (CAD44268.1). We would like to thank Prof. Paul Williams from the University of Nottingham and Prof. Tomohiro Morohoshi from the Utsunomiya University for kindly providing us with *Chromobacterium violaceum*-CV026 and VIR07 biosensor strains, respectively. The fosmid genomic libraries were constructed by the Clemson University Genomics Institute.

Conflict of interest This work was supported by non-profit organizations Fundación Ramón Areces (CIVP16A1814) and Fundación Barrié de la Maza.

This work is related to the following patents: Otero A, Romero M, Roca A. Use of bacteria of the genus *Tenacibaculum* for quorum quenching. WO2010/012852 A1; Otero A, Romero M, Mayer C (2013) Péptido con actividad inhibidora de quorum sensing, polinucleótido que codifica dicho péptido y sus aplicaciones. P201331060 (submitted for review).

References

- Bebrone C (2007) Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 74:1686–1701
- Bjarnsholt T, Givskov M (2007) Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:1213–1222
- Brameyer S, Kresovik D, Bode HB, Heermann R (2015) Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules. *PNAS* 112:572–577
- Cao Y, He S, Zhou Z, Zhang M, Mao W, Zhang H, Yao B (2012) Orally administered thermostable *N*-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. strain AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish. *Appl Environ Microbiol* 78:1899–1908
- Carlier A, Uroz S, Smadja B, Fray R, Latour X, Dessaux Y (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
- Chen R, Zhou Z, Cao Y, Bai Y, Yao B (2010) High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microb Cell Factories* 9:39
- Chow JY, Xue B, Lee KH, Tung A, Wu L, Robinson RC, Yew WS (2010) Directed evolution of a thermostable quorum-quenching lactonase from the amidohydrolase superfamily. *J Biol Chem* 285:40911–40920. doi:10.1074/jbc.M110.177139
- Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH (2000) AiiA, an enzyme inactivates acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3526–3531
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zang XF, Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813–817
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH (2002) Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 68:1754–1759
- Dong YH, Wang LY, Zhang LH (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc B* 362:1201–1211
- Dyszal JL, Soares JA, Swearingen MC, Lindsay A, Smith JN, Ahmer BMM (2010) *E. coli* K-12 and EHEC genes regulated by SdiA. *PLoS ONE* 5(1):e8946. doi:10.1371/journal.pone.0008946
- 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 signaling. *J Bacteriol* 178:6618–6622
- Guo X, Zhang LY, Wu SC, Xia F, Fu YX, Wu YL, Leng CQ, Yi PF, Shen HQ, Wei XB, Fu BD (2014) Andrographolide interferes quorum sensing to reduce cell damage caused by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 174:496–503
- Hawwa R, Aikens J, Turner R, Santarsiero BD, Mesecar AD (2009) Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys* 488:109–120
- Hentzer M, Givskov M (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112:1300–1307
- Hraiech S, Hiblot J, Lafleur J, Lepidi H, Papazian L, Rolain JM, Raoult D, Elias M, Silby MW, Bzdrenga J, Bregeon F, Chabriere E (2014) Inhaled lactonase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PLoS One* 9:e107125. doi:10.1371/journal.pone.0107125
- Kanamaru K, Kanamaru K, Tatsuno I, Tobe T, Sasakawa C (2000) SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 38:805–816
- Kaufman 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-*N*-acylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:309–314
- Lade H, Paul D, Kweon JH (2014) Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *Int J Biol Sci* 10: 550–565. doi:10.7150/ijbs.9028
- LaSarre B, Federle MJ (2013) Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:73–111
- Lin Y, Smith MP, Chapin KC, Suk Baik H, Bennett GN, Foster JW (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62:3094–3100
- 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
- Liu D, Momb J, Thomas PW, Moulin A, Petsko GA, Fast W, Ringe D (2008) Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-bound structures. *Biochemistry* 47: 7706–7714
- Liu CF, Liu D, Momb J, Thomas PW, Lajoie A, Petsko GA, Fast W, Ringe D (2013) A phenylalanine clamp controls substrate specificity in the quorum-quenching metallo- γ -lactonase from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry* 52:1603–1610
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Cámara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703–3711
- Mei GY, Yan XX, Turak A, Luo ZQ, Zhang LQ (2010) AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel *N*-acylhomoserine lactonase. *Appl Environ Microbiol* 76:4933–4942
- Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BM (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* 183:5733–5742
- Momb J, Wang C, Liu D, Thomas PW, Petsko GA, Guo H, Ringe D, Fast W (2008) Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. Substrate modeling and active site mutations. *Biochemistry* 47:7715–7725
- 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
- Morohoshi T, Wang WZ, Someya N, Ikeda T (2011) Genome sequence of *Microbacterium testaceum* StLB037, an *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacterium isolated from potato leaves. *J Bacteriol* 193: 2072–2073
- Morohoshi T, Tominaga Y, Someya N, Ikeda T (2012) Complete genome sequence and characterization of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. *J Biosci Bioeng* 113:20–25
- Morohoshi T, Tominaga Y, Someya N, Ikeda T (2014) Characterization of a novel thermostable *N*-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium *Thermaerobacter marianensis*. *J Biosci Bioeng*. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.11.014
- Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR (2003) Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:582–587
- Ng WL, Bassler BL (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43:197–222
- Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY, Lee JK (2003) AhID, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* 149:1541–1550
- 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
- Qazi S, Middleton B, Muharram SH, Cockayne A, Hill P, O'Shea P, Chhabra SR, Cámara M, Williams P (2006) *N*-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74:910–919
- Rahmati S, Yang S, Davidson AL, Zechiedrich EL (2002) Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* 43:677–685
- Rasch M, Buch C, Austin B, Slierendrecht WJ, Ekmann KS, Larsen JL, Johansen C, Riedel K, Eberl L, Givskov M, Gram L (2004) An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst Appl Microbiol* 27:350–359
- Rashid R, Morohoshi T, Someya N, Ikeda T (2011) Degradation of *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules by potato root surface-associated *Chryseobacterium* strains. *Microbes Environ* 26:144–148
- Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, 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
- Ren TT, Li XY, Yu HQ (2013) Effect of *N*-acyl-L-homoserine lactone-like molecules from aerobic granules on biofilm formation by *Escherichia coli* K12. *Bioresour Technol* 129:655–658
- 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
- Romero M, Avendaño-Herrera R, Magariños B, Cámara M, Otero A (2010) Acyl homoserine 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, Martín-Cuadrado AB, Roca-Rivada A, Cabello AM, Otero A (2011a) Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 75:205–217
- Romero M, Muro-Pastor AM, Otero A (2011b) Quorum sensing *N*-acyl-homoserine lactone signals affect nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *FEMS Microbiol Lett* 315:101–108
- Romero M, Martín-Cuadrado AB, Otero A (2012) Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences. *Appl Environ Microbiol* 78:6345–6348
- Romero M, Muras A, Mayer C, Buján N, Magariños B, Otero A (2014) In vitro quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. *Dis Aquat Org* 108:217–225
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* 4:47. doi:10.3389/fmicb.2013.00047
- Sharma VK, Bearson SMD (2013) Evaluation of the impact of quorum sensing transcriptional regulator SdiA on long-term persistence and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in weaned calves. *Microb Pathog* 57:21–26
- Smith JL, Fratamico PM, Yan X (2011) Eavesdropping by bacteria: the role of SdiA in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* quorum sensing. *Foodborne Pathog Dis* 8:169–178. doi:10.1089/fpd.2010.0651
- Soares JA, Ahmer BM (2011) Detection of acyl-homoserine lactones by *Escherichia* and *Salmonella*. *Curr Opin Microbiol* 14:188–193. doi: 10.1016/j.mib.2011.01.006

- Sperandio V (2010) SdiA sensing of acyl-homoserine lactones by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157:H7 in the bovine rumen. *Gut Microbes* 1:432–435. doi:10.4161/gmic.1.6.14177
- 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
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Tang K, Su Y, Brackman G, Cui F, Zhang Y, Shi X, Coenye T, Zhang XH (2015) MomL, a novel marine-derived *N*-acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*. *Appl Environ Microbiol* 81:774–782
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Uroz S, Oger PM, Chapelle E, Adeline MT, 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
- Van Houdt R, Aertsen A, Moons P, Vanoirbeek K, Michiels CW (2006) *N*-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 256:83–89
- Vogel HJ, Bonner DM (1956) Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* 218:97–106
- Walters M, Sperandio V (2006) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 296:125–131
- Wang LH, Weng LX, Dong YH, Zhang LH (2004) Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone lactonase (AHL lactonase). *J Biol Chem* 279:13645–13651
- Wang WZ, Morohoshi T, Someya N, Ikeda T (2012) AidC, a novel *N*-acylhomoserine lactonase from the potato root-associated *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) group bacterium *Chryseobacterium* sp. strain StRB126. *Appl Environ Microbiol* 78:7985–7992
- Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP (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. *Philos Trans R Soc B* 362:1119–1134
- Yamamoto K, Yata K, Fujita N, Ishihama A (2001) Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. *Mol Microbiol* 41:1187–1198
- Yang Y, Yao F, Zhou M, Zhu J, Zhang X, Bao W, Wu S, Hardwidge PR, Zhu G (2013) F18ab *Escherichia coli* flagella expression is regulated by acyl-homoserine lactone and contributes to bacterial virulence. *Vet Microbiol* 165:378–383
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, 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
- Zhang HB, Wang LH, Zhang LH (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4638–4643
- Zhang Y, Liu J, Tang K, Yu M, Coenye T, Zhang XH (2015) Genome analysis of *Flaviramulus ichthyoenteri* Th78 T in the family *Flavobacteriaceae*: insights into its quorum-quenching property and potential roles in fish intestine. *BMC Genomics* 16:38





Biofilm Formation and Quorum-Sensing-Molecule Production by Clinical Isolates of *Serratia liquefaciens*

Sara Remuzgo-Martínez,^a María Lázaro-Díez,^a Celia Mayer,^b Maitane Aranzamendi-Zaldumbide,^a Daniel Padilla,^c Jorge Calvo,^{a,e} Francesc Marco,^d Luis Martínez-Martínez,^{a,e,f} José Manuel Icardo,^g Ana Otero,^b José Ramos-Vivas^{a,e}

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla—IDIVAL, Santander, Cantabria, Spain^a; Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain^b; Instituto Universitario de Sanidad Animal, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Gran Canaria, Spain^c; Departamento de Microbiología Clínica, Hospital Clínic, CRESIB/IDIBAPS, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain^d; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^e; Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria, Spain^f; Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria, Spain^g

Serratia spp. are opportunistic human pathogens responsible for an increasing number of nosocomial infections. However, little is known about the virulence factors and regulatory circuits that may enhance the establishment and long-term survival of *Serratia liquefaciens* in the hospital environment. In this study, two reporter strains, *Chromobacterium violaceum* CV026 and VIR24, and high-resolution triple-quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) were used to detect and to quantify *N*-acyl-homoserine lactone (AHL) quorum-sensing signals in 20 *S. liquefaciens* strains isolated from clinical samples. Only four of the strains produced sufficient amounts of AHLs to activate the sensors. Investigation of two of the positive strains by high-performance liquid chromatography (HPLC)-MS confirmed the presence of significant amounts of short-acyl-chain AHLs (*N*-butyryl-*L*-homoserine lactone [C₄-HSL] and *N*-hexanoyl-*L*-homoserine lactone [C₆-HSL]) in both strains, which exhibited a complex and strain-specific signal profile that included minor amounts of other short-acyl-chain AHLs (*N*-octanoyl-*L*-homoserine lactone [C₈-HSL] and *N*-3-oxohexanoyl-*L*-homoserine lactone [OC₆-HSL]) and long-acyl-chain (C₁₀, C₁₂, and C₁₄) AHLs. No correlation between biofilm formation and the production of large amounts of AHLs could be established. Fimbria-like structures were observed by transmission electron microscopy, and the presence of the type 1 fimbrial adhesin gene *fimH* in all strains was confirmed by PCR. The ability of *S. liquefaciens* to adhere to abiotic surfaces and to form biofilms likely contributes to its persistence in the hospital environment, increasing the probability of causing nosocomial infections. Therefore, a better understanding of the adherence properties of this species will provide greater insights into the diseases it causes.

Serratia spp. are opportunistic Gram-negative bacteria that belong to the family *Enterobacteriaceae*. *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* are frequently encountered in nosocomial infections (1–4). *S. liquefaciens* is an increasingly recognized cause of transfusion-related sepsis and has been reported as a cause of meningitis, thrombophlebitis, corneal ulcers, and other infections (5–10). Moreover, *Serratia* species are inherently resistant to several antibiotics and are capable of readily acquiring resistance (11, 12).

N-Acylhomoserine lactone (AHL)-mediated quorum-sensing (QS) systems are cell density-dependent intercellular signaling mechanisms that regulate many physiological processes in Gram-negative bacteria. When the concentration of the molecule exceeds a threshold, signaling pathways are modulated, and the bacteria respond by modifying gene expression in a concerted manner throughout the population. This AHL-dependent QS system has been investigated extensively in *S. marcescens* strain MG1 (previously misidentified as *S. liquefaciens*) (13). Moreover, quorum sensing may play a role in biofilm formation in *S. marcescens* (14, 15). A biofilm can be defined as a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced polymeric matrix and adherent to an inert or living surface. Growth in biofilms enhances the survival of bacterial populations in hospital environments and during host infections (i.e., in the presence of antibiotics), increasing the probability of causing nosocomial infections (16–18). In addition, some biocides used in hospitals are ineffective against nosocomial pathogens growing as biofilms attached to surfaces (19). Biofilm formation has been connected to infections associ-

ated with indwelling medical devices, such as central venous catheters, urinary catheters, and contact lenses (20). Also, in hospitals, some medicinal products need to be stored at lower than ambient temperatures to ensure their quality and efficacy (vaccines, insulin, biotechnology products, drugs, etc.). Moreover, red blood cells or whole blood must always be stored at a temperature between 2 and 6°C to maintain the oxygen-carrying ability of blood and to minimize bacterial contamination. However, some psychrophilic, primarily Gram-negative pathogenic bacteria can proliferate from very low to clinically significant concentrations under storage conditions.

The goal of the present study was to analyze the abilities of 20 *S. liquefaciens* strains to produce quorum-sensing molecules, to ex-

Received 12 January 2015 Accepted 26 February 2015

Accepted manuscript posted online 6 March 2015

Citation Remuzgo-Martínez S, Lázaro-Díez M, Mayer C, Aranzamendi-Zaldumbide M, Padilla D, Calvo J, Marco F, Martínez-Martínez L, Icardo JM, Otero A, Ramos-Vivas J. 2015. Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol* 81:3306–3315. doi:10.1128/AEM.00088-15.

Editor: M. A. Elliot

Address correspondence to José Ramos-Vivas, jvivas@idival.org.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00088-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00088-15

TABLE 1 *S. liquefaciens* strains used in this study and their phenotypic characteristics

Strain no. ^a	Clinical source	QS ^b detected with:		Biofilm formation ^c at 4°C in:					Diam (mm) of swimming motility zone ^g at:	
		CV026	VIR24	LB	LB _{1/4}	HA ^d	Fimbriae ^e	AA ^f	37°C	24°C
1	Bone	–	–	++	+/-	–	++++	+	0	7
2	Blood	+++	+	++	++	MRHA	++++	+	0	58
3	Wound exudate	–	–	–	–	–	+++	+	0	14
4	Abdominal drainage	+++	+	+++	++	–	+++	+	11	41
5	Surgical wound exudate	–	–	+/-	+/-	–	+++	–	11	43
6	Diabetic foot exudate	–	–	+++	++	–	++	–	9	31
7	Buccal smear	++	+	+/-	+/-	MSHA	+++	+	0	0
8	Bile	–	–	+++	++	MSHA	+++	–	0	41
9	Urine	–	–	–	–	–	+++	–	12	40
10	Bone	–	–	+++	++	–	+	–	11	46
11	Ulcer	–	–	+++	++	MSHA	+++	–	7	54
12	Tracheal aspirate	–	–	+++	++	–	+++	–	7	36
13	Urine	–	–	+/-	+/-	–	++++	+	15	35
14	Skin vesicle	–	–	++	++	MRHA	+++	–	8	40
15	Blood	–	–	++	++	–	+++	–	9	32
16	Ulcer	+++	+	+++	++	MSHA	+++	+	20	27
17	Skin smear	–	–	+++	+/-	MSHA	+++	–	8	25
18	Urine	–	–	+/-	+/-	–	+++	–	10	25
19	Urine	–	–	+++	++	MSHA	+++	–	26	51
20	Thigh bone graft	–	–	+++	++	–	+++	–	20	42

^a Strains (from the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla) are designated as follows: 1, HUMV 526; 2, HUMV 6339; 3, HUMV 6313; 4, HUMV 4524; 5, HUMV 4205; 6, HUMV 3632; 7, HUMV 3365; 8, HUMV 701; 9, HUMV 412; 10, HUMV 6817; 11, HUMV 5610; 12, HUMV 4222; 13, HUMV 2617; 14, HUMV 335; 15, HUMV 2935; 16, HUMV 21; 17, HUMV 185; 18, HUMV 405; 19, HUMV 779; 20, HUMV 3250.

^b Induction of violacein biosynthesis by AHLs in the *C. violaceum* reporter strains CV026 and VIR24 using the biosensor plate bioassay at 37°C, 25°C, and 4°C. Symbols indicate no induction – or weak (+), moderate (++), or strong (+++) induction.

^c Biofilm formation in LB or LB_{1/4} at 4°C after 5 days. Symbols indicate no biofilm formation – or weak (+/-), moderate (++), or strong (+++) biofilm formation.

^d MSHA, mannose-sensitive hemagglutination; MRHA, mannose-resistant hemagglutination; –, no agglutination of human red blood cells.

^e Data obtained by TEM were expressed as the percentage of fimbriated bacteria at 37°C, and strains were scored as follows: + + + +, >95% fimbriated; + + +, >75% fimbriated; + +, ~40 to 60% fimbriated; +, <5% fimbriated.

^f AA, autoagglutination at 4°C in 96-U-bottom microplates. +, autoagglutination; –, no autoagglutination.

^g Results are averages from three independent experiments showing standard deviations of <10%.

press surface appendages, and to form biofilms during growth at different temperatures and under different medium conditions. Identifying these parameters should contribute to a better understanding of the correlation between the adherence capabilities and the pathogenicity of this bacterium.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Twenty *S. liquefaciens* strains were isolated from different clinical samples at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla in Santander, Spain (Table 1). All the strains have caused moderate or severe illness in monomicrobial infections and were considered not merely colonizers. All isolates were primarily identified as *S. liquefaciens* complex by the Vitek 2 automated system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Species identification by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) was performed in a Bruker Daltonics MALDI-TOF mass spectrometry device (Microflex; Bruker Daltonics) with flexControl software, which is able to differentiate between the three species of the *S. liquefaciens* complex (*S. liquefaciens*, *Serratia grimesii*, and *Serratia proteamaculans*). This system uses *Serratia liquefaciens* (ATCC 27592), *S. grimesii* (ATCC 14460), *Serratia proteamaculans* subsp. *proteamaculans* (ATCC 19323), and *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* (ATCC 33765) as reference strains.

The strains were routinely cultured on blood agar (BA) plates and in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C and were frozen at –80°C with 20% glycerol. *Chromobacterium violaceum* strain CV026, used in bioassays for the production of quorum-sensing molecules, has been described else-

where (21). *C. violaceum* strain VIR24 is a new reporter strain for long-*N*-acyl-chain homoserine lactones, which cannot be detected by CV026 (22). Both *C. violaceum* strains were grown at 25°C on LB agar plates.

Enterobacter sp. strains HUMV 2104, HUMV 4605, and HUMV 5198 were used as non-AHL-producing strains.

AHL bioassays. Acylhomoserine lactone production by *S. liquefaciens* strains was detected by streaking against the biosensor strains CV026 and VIR24. Assay results were judged positive by induction of the purple pigment violacein in the *C. violaceum* reporters, as described previously (23). The plates were incubated for 48 h at 25°C, the optimal growth temperature for the *C. violaceum* biosensors. After incubation, the boundary of each reporter strain with each *S. liquefaciens* isolate tested was examined for violacein biosynthesis.

The production of AHLs in the extracellular products (ECPs) of *S. liquefaciens* was also tested after growth at 37°C, 25°C, and 4°C. *S. liquefaciens* strains were grown either for 24 h at 37°C or 25°C in tryptic soy broth (TSB), LB broth, or brain heart infusion broth (BHIB) or for 5 days at 4°C in LB broth or LB broth diluted 1:4 (LB_{1/4}). Strains were then collected by centrifugation at 7,000 rpm for 5 min at room temperature (RT) using a microcentrifuge. Spent culture media (cell-free ECPs) were sterilized via membrane filtration (0.22 μm; Millipore), and 100 μl was used to stimulate violacein production in the reporter strains.

To prepare *C. violaceum* suspensions, bacteria were grown on LB agar plates at 25°C for 48 h, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), and adjusted spectrophotometrically to approximately 5.5 × 10⁹ CFU ml⁻¹ (optical density at 620 nm [OD₆₂₀], 0.15). One hundred microliters

of each culture suspension was added to the plates and was air dried for 30 min. Control plates with CV026 or VIR24 were incubated with the same volumes (100 μ l) of fresh bacterial culture medium. Plates were incubated for 48 h at 25°C.

Mixing experiments using ECPs from AHL-producing strains. Biofilm formation was also analyzed qualitatively in different strains after growth in the presence of spent culture media from the four AHL-producing strains, in order to determine if the presence of AHLs will favor or prevent biofilm formation in heterologous strains. In each well (24-well plate format), spent culture media from AHL-producing strains (750 μ l) were mixed with 750 μ l of LB broth and were inoculated with the test strain. Plates were incubated at 37°C or 25°C for 24 h, and biofilms were stained with crystal violet (CV) and were photographed. LB broth alone was inoculated with the test strain as a control.

AHL extraction and liquid chromatography (LC)-MS identification. Samples (100 ml) from spent culture media of *S. liquefaciens* strains grown in liquid LB medium were obtained 24 h after inoculation at 37°C, acidified to pH 2 with 1 M HCl in a shaker at 200 rpm for 24 h at 20°C to ensure the absence of any AHL lactonolysis products, and extracted with dichloromethane as described previously (24). Dried extracts were reconstituted in 1 ml acetonitrile and were stored at -20°C until further analysis.

Analyses were carried out using an Agilent 1100 series high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Agilent, Santa Clara, CA). The column was a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (length, 150 mm; inside diameter, 4.6 mm; particle size, 5 μ m). The mobile phase was built by 0.1% formic acid in water (A) and methanol (B), and the flow rate was 0.4 ml min⁻¹. The gradient profile was as follows: first 50% B from 0 to 10 min, then a linear gradient from 50 to 90% B over 15 min, and finally 90% B for 25 min. The column was reequilibrated for a total of 4 min. Samples (2 μ l) were diluted in 0.1% formic acid in acetonitrile and were injected onto the column.

MS experiments were conducted on an API 4000 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a Turbo ion 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, MS2). The conditions for the generation of the MRM-triggered spectra were as follows: declustering potential (DP) ramped from 35 to 57; collision energy (CE), 14 to 28; collision cell exit potential (CXP), 8.

AHLs with acyl chains of 4 (C₄-HSL, 3-hydroxy-C₄-HSL), 6 (C₆-HSL, 3-hydroxy-C₆-HSL, OC₆-HSL, 3-oxo-C₆-HSL), 8 (C₈-HSL, 3-hydroxy-C₈-HSL), 10 (C₁₀-HSL, 3-hydroxy-C₁₀-HSL), 12 (C₁₂-HSL, 3-hydroxy-C₁₂-HSL), or 14 (C₁₄-HSL, 3-hydroxy-C₁₄-HSL) carbon atoms were used as standards (Sigma). AHLs were identified and confirmed by comparing both the elution time and the spectra from any peaks obtained with those of the standards. The AHLs were quantified by comparison with a calibration curve constructed for molecular ion abundance, using each of the appropriate AHL synthetic standards (25).

Biofilm formation. Biofilm formation was estimated in 96-well U-bottom polystyrene microtiter plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific) by the method of O'Toole and Kolter (26) with some modifications. *S. liquefaciens* strains were grown in LB medium for 24 h at 37°C with shaking, and a 1:1,000 dilution was prepared in PBS (OD₆₂₀ ~0.01). Five microliters was placed in each well containing 145 μ l of culture medium. The microplates were incubated for 24 h at 24°C or 37°C. Planktonic cells were removed, and the number of CFU was determined. Wells containing biofilms were rinsed three times with distilled water (200 μ l/well), and the remaining adherent bacteria were stained with 190 μ l/well of crystal violet (0.7% [wt/vol] solution; Sigma-Aldrich) for 12 min. Excess stain was removed by three washes with distilled water. Crystal violet was extracted by an ethanol-acetone solution (80:20, vol/vol), and the plates were incubated at RT in an orbital shaker for 1 min at 400 rpm (Thermomixer comfort; Eppendorf) to release the dye into the solution. Then a sample of 100 μ l was transferred to another 96-well flat-bottom plate, and the

amount of dye (proportional to the density of adherent cells) was determined at 620 nm using a microplate reader (Multiskan FC; Thermo Fisher). In each experiment, results were corrected for background staining by subtracting the value for crystal violet bound to uninoculated controls. The biofilm assay was performed three times, with octuplicates in each assay. TSB, LB broth, and BHIB were employed in experiments carried out at 24°C and 37°C. LB broth and LB broth diluted 1:4 in PBS were employed in experiments carried out at 4°C in 96- and 24-well plates. Biofilms were formed under static conditions. The number of CFU was converted to a logarithmic scale, and normalized biofilms were calculated by dividing the total biofilm value (expressed as the OD₆₂₀) by the bacterial growth for each strain (expressed in CFU).

SEM. Biofilm formation was also analyzed qualitatively using scanning electron microscopy (SEM) in 24-well plates (Nunc, Thermo Scientific). Biofilms were processed directly inside the plates after the removal of culture media and washing. The entire wells were fixed with ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4°C. Wells were then dehydrated in a graded ethanol series, cut into small pieces with a hot lancet, dried by the critical point method, coated with gold in a Fine Coat ion sputter (JFC-1100; JEOL), and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 15 or 20 kV (see Fig. S1 in the supplemental material).

CLSM. Bacteria were grown in uncoated 4-well μ -slides (Ibidi, Martinsried, Germany) without shaking. The slides were placed inclined (~45°) into an incubator to form a liquid-air interface (see Fig. S2A in the supplemental material). After 24 h, unfixed planktonic cells were removed by rinsing with saline (0.85% NaCl), and bacterial viability within biofilms was determined by using the BacLight LIVE/DEAD bacterial viability kit (Molecular Probes Inc.). A series of optical sections was obtained with a Nikon A1R confocal scanning laser microscope (CLSM); the excitation wavelengths were 488 nm (green) and 561 nm (red), and 500- to 550-nm and 570- to 620-nm emission filters were used, respectively. Images at the liquid-air interface were captured at random with a 20 \times Plan Apo (numerical aperture [NA], 0.75) objective. Reconstructions of confocal sections were assembled using NIS-Elements software, version 3.2.

HA and HA inhibition tests. To identify other factors associated with biofilm formation, we studied the hemagglutinating activities of the strains with human group A erythrocytes and the mannose sensitivities of these agglutinations. Human erythrocytes were obtained from healthy volunteers after informed consent. Hemagglutination (HA) tests were performed on microscope slides using 10% suspensions of human group A erythrocytes. Bacteria were cultured at 37°C for 24 h in LB medium, washed, and suspended in PBS to a concentration of ~5 \times 10⁹ per ml. Twenty-five microliters of cultures was mixed with 25 μ l of erythrocytes with or without 1% D-mannose (Sigma). Agglutination of erythrocytes was examined visually after a short period (up to 1 min) of rocking at RT. Hemagglutination was considered resistant to mannose (MRHA) when it occurred despite the presence of mannose and sensitive to mannose (MSHA) when it was inhibited by the presence of this carbohydrate.

Detection of genes encoding type I fimbriae by PCR. All *S. liquefaciens* strains were analyzed genotypically by PCR using primers specific for the type 1 fimbrial adhesin FimH (fim-f, 5'-AACAGCGATCATTCCAGTTTGTGTG-3'; fim-r, 5'-ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC-3') as described previously (27). Briefly, bacterial DNA was extracted using the QIAamp DNA minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and PCR amplification was carried out in a Mastercycler pro S thermal cycler (Eppendorf, Germany) in a 50- μ l reaction mixture containing 1 \times PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM each 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate (dNTP), 1 μ M each forward and reverse primer, 1.25 U of DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific), and 25 ng of genomic DNA. PCR conditions were typically as follows: one initial denaturation at 94°C for 3 min; 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were resolved by electrophoresis on 1.5% agarose gels in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer and were stained with

Sybr Safe stain (Invitrogen). *Escherichia coli* strain MG1655 was used as a positive control.

TEM. All *S. liquefaciens* strains were examined by transmission electron microscopy (TEM) after growth at 37°C to confirm the presence of pili and flagella. Some strains were arbitrarily selected after growth at 4°C to compare the effects of temperature on the production of pili and flagella. Bacteria were applied to Formvar-coated grids and were air dried. The cells were then negatively stained with 1% phosphotungstic acid in distilled water for 20 s and were examined with a JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL) operating at 80 kV and equipped with an Orius SC1000 charge-coupled device (CCD) camera (Gatan). At least 200 bacterial cells from each strain were examined for the presence of pili, and the percentage of piliated cells was determined.

Motility assays. *S. liquefaciens* strains were grown in LB medium for 24 h at 37°C with shaking, and a 1:1,000 dilution was prepared in PBS (OD₆₂₀ ~0.01). Motility assays were performed as described previously (27). Briefly, tryptone swim plates (1% tryptone, 0.5% NaCl, and 0.3% agar) dried overnight at RT were point inoculated with bacteria using sterile toothpicks and were incubated for 24 h at 24°C or 37°C, and motility was assessed by the size of the circular zone. For swarming, tryptone swarm plates (1% tryptone, 0.5% NaCl, and 0.6% agar) dried overnight at RT were inoculated with bacteria using sterile toothpicks and were incubated for 24 h at 24°C or 37°C; the sizes of the swarming zones were observed macroscopically; and motility was assessed by the size of the circular zone. The diameters of the swimming motility zones were measured and are expressed as means for two independent experiments. Appropriate positive- and negative-control strains for swarming were included in the study (*Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and *Aeromonas hydrophila* HUMV 1439, respectively).

Statistics. The effects of temperature and the culture medium on biofilm formation were analyzed statistically using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test using Excel (Microsoft Corporation, USA). Statistical significance was set at a two-tailed *P* value of <0.05. Data are presented as means ± standard deviations (SD) for three independent experiments. Each experiment was carried out in octuplicate wells.

RESULTS

Induction of violacein biosynthesis in AHL reporters by *S. liquefaciens* clinical isolates. The AHL reporter strains *C. violaceum* CV026 and VIR24 differed in sensitivity to the AHL molecules in the simple biosensor plate assay. Only four *S. liquefaciens* isolates (20%) were found to induce violacein production in the reporter strains (Table 1; Fig. 1). The production of AHLs by *S. liquefaciens* was also tested after growth at 37°C or 25°C using cell-free ECPs (see Fig. S3 in the supplemental material) and after growth at 4°C using cell-free ECPs from wells containing biofilms (see Fig. S4a in the supplemental material). Only ECPs from the same four strains induced the production of pigment in *C. violaceum*. The presence of AHLs was also investigated by HPLC-MS in ethyl acetate extracts of acidified culture media from two positive *S. liquefaciens* strains (strains no. 7 and 16) and one negative isolate (strain no. 15). The low C₄-HSL concentration retrieved in the culture medium of *S. liquefaciens* strain no. 15 (Table 2) is consistent with the negative response of this strain in the bioassay, where it failed to induce violacein production in either biosensor (Table 1). In contrast, LC-MS analysis revealed complex and strain-specific AHL profiles for the two strains capable of activating the sensors. Large amounts of *N*-butyryl-L-homoserine lactone (C₄-HSL) and *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C₆-HSL) were found in the two positive strains studied, results consistent with the strong activation of the short-chain biosensor in these strains. *N*-Octanoyl-L-homoserine lactone (C₈-HSL) was also present in small amounts in the two strains producing positive results in the bioassay. Small

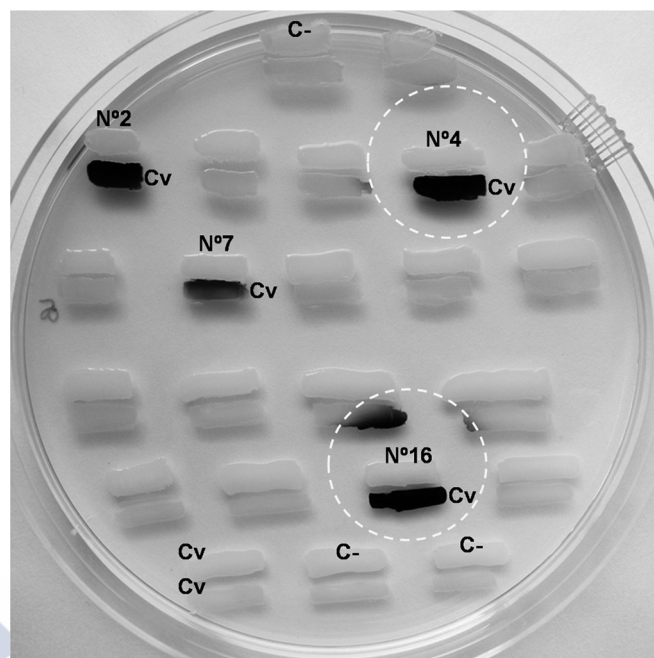


FIG 1 Bioreporter-based detection of AHL production by *S. liquefaciens* strains. Shown are examples of agar plate assays for AHL production at 25°C by *S. liquefaciens* isolates from clinical samples. The reporter strain (CV026) was streaked parallel to the test strains. The development of violet pigment in the reporter strain indicated the production of violacein. Strains no. 2, 4, 7, and 16 were positive. Negative controls (*Enterobacter* spp.) (top and bottom) were also included. Dashed circles indicate apparent diffusion halos. C-, negative control; Cv, *C. violaceum*.

amounts of *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone (C₁₂-HSL) and *N*-tetradecanoyl-L-homoserine lactone (C₁₄-HSL) were also detected in the two strains (see Fig. S5 in the supplemental material). However, the production of *N*-decanoyl-L-homoserine lactone (C₁₀-HSL) and *N*-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone (OC₆-HSL) was strain dependent (Table 2).

Biofilm formation by *S. liquefaciens*. The ability of *S. liquefaciens* to form biofilms was assessed by culturing the clinical isolates in three different culture media at 24°C and 37°C. Biofilms formed were quantified by crystal violet (CV) staining after 24 h. Biofilm analysis revealed a wide range of phenotypes. To quantify specific biofilm-forming ability, the normalized biofilm value was calculated by dividing the total biofilm value (expressed as the OD₆₂₀) by the bacterial growth (expressed in CFU) for each strain (Fig. 2). Temperature had a significant impact on the biofilm-forming ability of *S. liquefaciens* (see Fig. S6 in the supplemental material). *S. liquefaciens* strains grew faster at 24°C than at 37°C, but bacterial growth was, in general, not strongly influenced by the culture medium, as estimated by the CFU of planktonic cells at both temperatures (see Fig. S7 in the supplemental material).

For the investigation of biofilm morphology in *S. liquefaciens*, three strains (strains no. 1, 7, and 13) were arbitrarily selected. The biofilms were found at the liquid-air interface, and this was imaged by SEM (Fig. 3). Similar results were observed using different plastic brands (Costar, Fisher Scientific, and Eppendorf) (data not shown).

Morphology was found to be variable, even for biofilms formed by the same strain assayed at different temperatures. At

TABLE 2 Quantification of AHLs in ECPs from different *S. liquefaciens* strains by HPLC-MS

<i>S. liquefaciens</i> strain no.	Activation of biosensors	Concn (nM) ^a						
		C ₄ -HSL	C ₆ -HSL	C ₈ -HSL	C ₁₀ -HSL	C ₁₂ -HSL	C ₁₄ -HSL	OC ₆ -HSL
7	+	669.85	7.41	0.19	<0.1 ^b	<0.1 ^b	<0.1 ^b	ND
16	+	4.3	25.79	0.72	ND	<0.1 ^b	0.66	13.79
15	–	0.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a *S. liquefaciens* cultures were grown in liquid LB medium for 24 h at 37°C. ND, not found/not determined.

^b The signal was detected and was correctly identified by MS, but the concentration did not allow reliable quantification.

24°C, strains no. 1 and 13 formed thick biofilms with small, hilly structures spatially distributed (Fig. 3a and c). In contrast, the same strains formed smooth, flat biofilms at 37°C (Fig. 3b and d). Interestingly, many cells of strain no. 1 showed a wide range of abnormalities; some appeared to have lost the cytoplasmic material and had collapsed. These cells seemed transparent, with a ghost-like appearance. Moreover, the elongated cells crossed over/under each other or appeared to intersect (Fig. 3b'). This phenomenon was clearly observed only in this strain. CLSM revealed that these cells were likely to undergo filamentous growth before dying, measuring as much as 60 μm in length, or even more, as shown in Fig. S2B in the supplemental material.

SEM analysis of strain no. 7 cultured at 24°C showed the presence of strong biofilms and visible microcolonies (Fig. 3e and e'). However, this strain formed a few small groups of bacteria sparsely distributed at 37°C (Fig. 3f and f'). SEM also showed that cells of each of the three strains were linked to each other through extracellular appendages, possibly pilus-like structures (arrows in Fig. 3c' and d'). Additionally, bacteria were almost entirely encased in an exopolysaccharide matrix (Fig. 3a', c', and d'). Figure 3e' shows a more sparsely populated region on the plastic surface where the individual bacteria can be visualized.

The biofilm formation assay was also performed at 4°C in 96-well plates. At that temperature, 7 strains showed autoagglutination (data not shown), while the other 13 strains did not (Table 1). Consequently, we decided to perform a qualitative biofilm assay at 4°C in 24-well plates using LB medium and LB medium diluted 1:4 in order to observe biofilm formation under reduced-nutrient conditions. Representative examples of biofilm formation in 24-well plates by the 20 *S. liquefaciens* strains after 5 days of growth at 4°C are shown in Fig. 4 and Fig. S4b in the supplemental material.

At 4°C, the colonization of plastic surfaces was very slow. However, after 5 days of incubation, many strains formed biofilms that could be classified as strong, moderate, or weak. Fourteen strains were found to form moderate to strong biofilms, and six strains exhibited weak biofilm formation or none. At this temperature, bacterial populations increased progressively over time for all strains, reaching counts from ~6 × 10⁸ CFU ml⁻¹ for strain no. 3 to ~2.8 × 10⁹ CFU ml⁻¹ for strain no. 8. Similar counts were obtained in cultures growing on LB_{1/4} medium (data not shown). Curiously, nutrient levels in the system did not greatly affect biofilm formation (Table 1).

In mixing experiments using *S. liquefaciens* ECPs from the four AHL-producing strains, we observed that spent media from these strains did not promote or affect biofilm formation in the same strain or in heterologous strains (producing or nonproducing strains). The same results were observed at 37°C and at 25°C. Some examples are shown in Fig. S8 in the supplemental material.

Surface appendages in *S. liquefaciens*. Hemagglutination was observed in eight strains (40%). HA was mannose sensitive in six cases and mannose resistant (MR) in the other two (Table 1). All but one of the isolates, including all the HA-positive isolates, were piliated at 37°C (Table 1). Representative TEM images of selected strains are shown in Fig. 5. Growth temperature affects pilus production. For example, strain no. 10 showed a smooth surface in the majority of the population (Fig. 5e) at 37°C. In contrast, more piliated cells appeared in this strain at 4°C (Fig. 6b).

There was no correlation between biofilm formation and MR agglutination of human erythrocytes. Of note, strains exhibiting strong biofilm formation at 37°C (strains no. 1, 3, 13, and 18) gave negative results in all the hemagglutination tests. Furthermore,

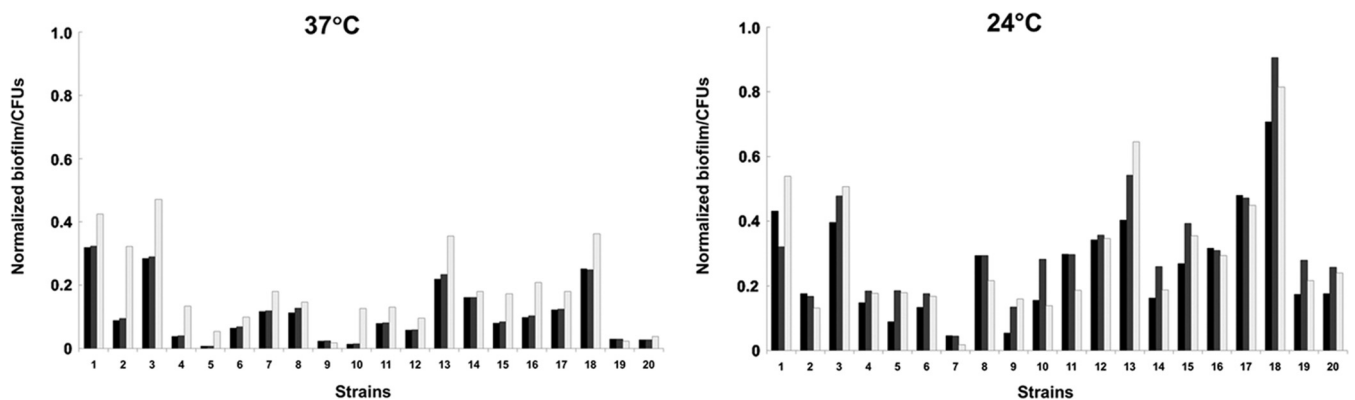


FIG 2 Normalized biofilm formation, calculated as total biofilm (expressed as the OD₆₂₀) divided by growth (expressed in CFU). Incubation temperatures were 37°C (left) and 24°C (right). Black bars, LB medium; gray bars, TSB; white bars, BHIB. Strain designations corresponding to the numbers are given in Table 1, footnote a.

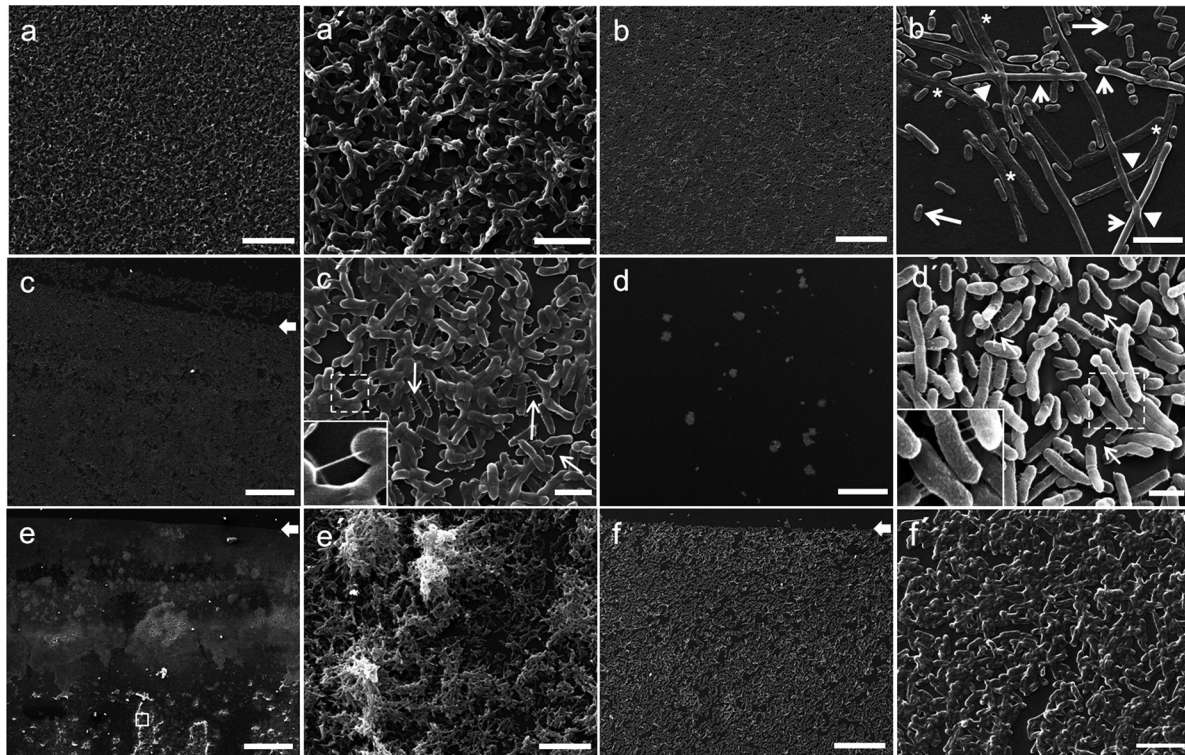


FIG 3 Scanning electron microscopy of *S. liquefaciens* biofilms. Shown are representative scanning electron micrographs of bacterial biofilms formed on plastic surfaces at the liquid-air interface in LB medium. (a and a') Strain no. 1 at 24°C; (b and b') strain no. 1 at 37°C; (c and c') strain no. 13 at 24°C; (d and d') strain no. 13 at 37°C; (e and e') strain no. 7 at 24°C; (f and f') strain no. 7 at 37°C. Arrows in panels c, e, and f indicate the air-liquid interface. Arrows in panels c' and d' indicate putative pili. Note that pili were not limited to the polar region (as a polar flagellum would be). Panel b' is a detail of strain no. 1 showing three distinct morphotypes in a biofilm: normal cells (long arrows), elongated cells (short arrows), and ghost cells (asterisks). Arrowheads indicate elongated cells that appear to intersect. Panel e' is a detail of the boxed area in panel e. Magnifications: $\times 1,800$ (a and b), $\times 10,000$ (a', b', and f'), $\times 1,000$ (c), $\times 15,000$ (c'), $\times 200$ (d and e), $\times 20,000$ (d'), $\times 3,500$ (e'), and $\times 2,000$ (f). Bars: 25 μm (a, b, and f), 5 μm (a', b', and f'), 50 μm (c), 2.5 μm (c' and d'), 250 μm (d and e), and 15 μm (e').

the strains were examined genotypically by PCR for the presence of type I fimbriae, and all strains were positive (data not shown).

Interestingly, in several strains, including strain no. 1 (Fig. 6a), strong biofilm production at 4°C was accompanied by the presence of multiple flagella. In this strain, pili were long at 4°C, becoming shorter at 24°C and scarce at 37°C. Interestingly, strain no. 7 was unable to form biofilms at 4°C (Fig. 4; see also Fig. S4b in the supplemental material), and no flagella could be detected (Fig. 6c).

Motility in *S. liquefaciens*. To investigate whether motility was correlated with biofilm formation, swimming motility and swarming motility were analyzed at 24°C and 37°C for all *S. liquefaciens* strains. Most strains showed swimming ability at 24°C, but this ability was reduced or suppressed at 37°C (Table 1). On swarming plates, most of the isolates were unable to spread minimally and showed only pinpoint colonies at both temperatures. The positive-control strain (*P. aeruginosa* PAO1) swarmed, producing tendrils that covered >80% of the plates within 24 h, while the negative-control *A. hydrophila* strain did not swarm (not shown).

DISCUSSION

Many bacterial behaviors, including biofilm formation, are regulated by quorum sensing. We aimed to gain knowledge about this system in *S. liquefaciens* clinical isolates. *C. violaceum* CV026 is a well-known AHL reporter strain, but this strain could not recog-

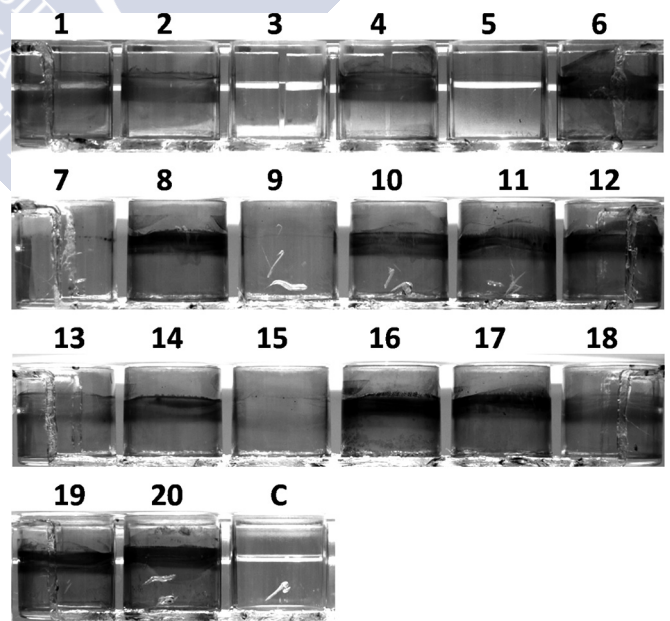


FIG 4 Biofilm formation at 4°C by the 20 *S. liquefaciens* strains. Shown are representative examples of biofilm formation in 24-well plates by the 20 *S. liquefaciens* strains after 5 days of growth at 4°C in LB medium. Wells were stained with CV. Strain designations corresponding to the numbers are given in Table 1, footnote a. C, uninoculated control.

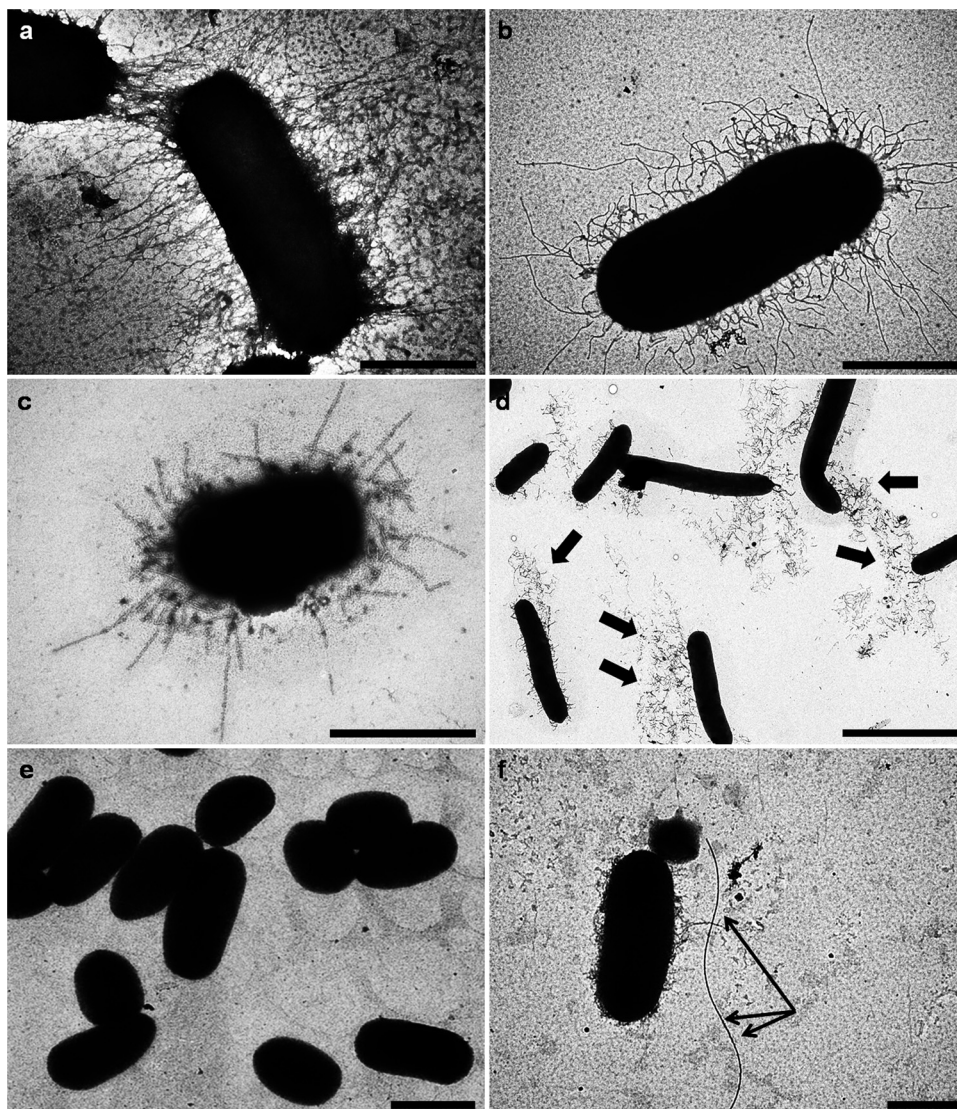


FIG 5 Examples of transmission electron micrographs of negatively stained bacteria grown for 24 h in LB medium at 37°C. (a) Strain no. 14; (b) strain no. 19; (c) strain no. 20; (d) strain no. 1; (e) strain no. 10; (f) strain no. 16. Note the detachment of pili from the bacterial surface of strain no. 1 (indicated by arrows in panel d). Arrows in panel f indicate a single flagellum. Magnifications: $\times 40,000$ (a and b), $\times 50,000$ (c), $\times 8,000$ (d), $\times 10,000$ (e), $\times 25,000$ (f). Bars: 0.5 μm (a through c), 2.5 μm (d), 1.25 μm (e), and 1 μm (f).

nize long-acyl-chain homoserine lactones such as C_{10} - and C_{14} -HSLs. Strain VIR24 could detect long-acyl-chain HSL molecules not detected by CV026 (22). It is well known that *Serratia* spp. may utilize quorum sensing for motility, extracellular and cell-associated enzyme production, and pigment synthesis (15, 28). However, the role of an AHL-mediated QS system in *S. liquefaciens* is less well understood, because most studies were performed with an *S. liquefaciens* strain, MG1, that has recently been reclassified as *Serratia marcescens*. In the present work, there is no evidence of any correlation between AHL production and motility for the different *S. liquefaciens* strains. To complicate this matter, at least four different QS systems have been described in *Serratia* spp. (29). Our results showed that AHL-mediated QS in *S. liquefaciens* is not dominant (only four strains showed pigment induction in *C. violaceum*), and other molecules may play important signaling roles in this species.

The ability of nosocomial pathogens to form biofilms is of significant clinical interest, since biofilm formation influences the efficacy of antimicrobial therapy and the outcome of an infection. Moreover, biofilm formation may contribute to the establishment and long-term survival of bacterial pathogens in the hospital environment.

A number of previous studies have shown that the nutrient content of the growth medium influences biofilm development in different organisms. More specifically, environmental factors such as glucose and temperature affect biofilm development in *Enterobacteriaceae* and other bacteria (30–32). Other environmental conditions, such as limited nutrient levels, may also serve as signals for the expression of biofilm-related genes. Given that biofilm formation is reported to enhance bacterial survival, colonization, and protection from antibiotics and host immune responses, the ability of *S. liquefaciens* to form biofilms may repre-

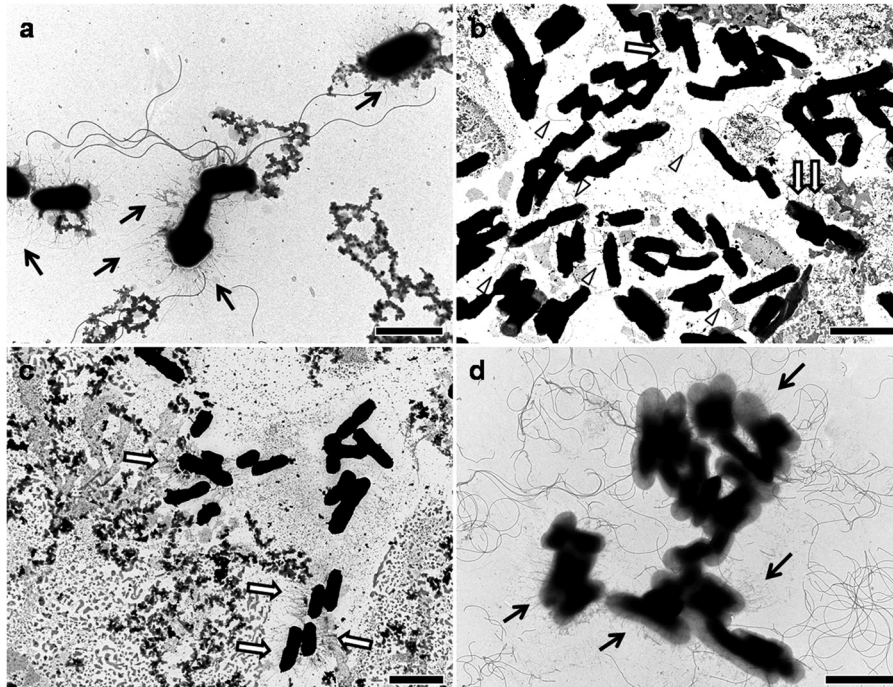


FIG 6 Examples of transmission electron micrographs of negatively stained bacteria after growth at a low temperature (4°C). (a) Strain no. 1; (b) strain no. 10; (c) strain no. 7; (d) strain no. 11. Arrows indicate pili, and arrowheads in panel b indicate flagella. Magnifications: $\times 12,000$ (a and d), $\times 10,000$ (b), $\times 8,000$ (c). Bars: 2.5 μm (a and d) and 5 μm (b and c).

sent an important virulence mechanism in relation to its pathobiology. We determined the absence of correlation between the ability to form biofilms and the type of infection or body site from which isolates were collected. Furthermore, we demonstrated that the production of C₄- or C₆-HSL by *S. liquefaciens* is not essential for biofilm formation.

Representative isolates positive for biofilm formation, as determined by the microtiter method, were selected for SEM analysis. In agreement with the results from the CV assay, SEM studies demonstrated that the strains selected were capable of forming biofilms in a temperature-dependent fashion. In addition, the structure of the biofilms and the phenotypes observed were unique for each strain tested.

During biofilm formation, bacteria express a diverse arsenal of factors that might affect adhesion, including physical interactions between bacteria and the substratum, pili, flagella, and the presence of extracellular polymeric substances. MSHA results from the expression of type I pili, whereas MRHA results from the expression of P, S, and/or other adhesins. Labbate and coworkers (33) showed that type I fimbriae were necessary for the attachment of *Serratia marcescens* to epithelial cells. Also in *S. marcescens*, Shanks and coworkers showed that type I fimbriae were essential for biofilm formation (34). Moreover, several authors have found a positive correlation between biofilm formation, cell motility, and the presence of type I pili in *Escherichia coli* strains (35). In *Klebsiella pneumoniae*, the expression of type III fimbriae was found to strongly promote biofilm formation (36). Under TEM, a wide variety of different morphological types of pili have been observed in *S. liquefaciens*. Moreover, the expression of pili in individual cells of some strains is highly variable, as indicated by the presence of fimbriated and nonfimbriated bacterial cells in the

same culture. This has also been reported for other species of the *Enterobacteriaceae* and could be indicative of phase variation (27, 37–40). However, not all fimbrial operons are regulated by phase variation; further work should be done, and genetic evidence should be provided, before any conclusion can be drawn on phase variation of specific fimbriae in *S. liquefaciens*.

Furthermore, SEM images showed pilus-like structures that seemed to promote bacterium-to-bacterium interactions in addition to adhesion to inert surfaces. However, we do not discard the possibility that these pilus-like structures could also be desiccated matrix material. Our study strongly indicates that strain background plays an important role in the impact of surface appendage expression on biofilm formation in *S. liquefaciens*. Hence, there is a great deal of interest in further identifying and characterizing these structures, including their exact adhesive capabilities.

Concerning flagellar expression, our observations reflect the fact that temperature is very important for the production of lateral flagella and motility in *S. liquefaciens*. Downregulation of swimming motility is observed in response to a temperature upshift from 24 to 37°C. At 24°C, swimming motility in *S. liquefaciens* (but not swarming) may play an important role in increasing biofilm biomass during growth. This phenomenon has also been observed in *S. marcescens* (41). We have found an exception, strain no. 7, which was able to form biofilms at 37°C despite its lack of swimming and swarming motility, indicating that flagella are not a prerequisite for biofilm formation, or that motility does not make a large contribution to biofilm formation in this strain. Once again, bacteria growing at 4°C were also able to express multiple flagella, which may contribute to biofilm formation at

low temperatures. At this point, neither flagellated cells nor biofilm formation was observed in strain no. 7 at 4°C.

Also, nutrient limitation can produce diverse responses in bacteria, i.e., reductions in cell size, modulation of gene expression, and changes in bacterial morphology. We have shown that under reduced-nutrient conditions, the level of biofilm formation is maintained. Hence, the combination of temperature and nutrient availability can affect the attachment and survival of *S. liquefaciens* strains under storage conditions. Importantly, Greco and coworkers have shown recently that *S. marcescens* and *S. liquefaciens* form biofilms under platelet storage conditions in hospitals, a phenomenon associated with reduced detection by colony counting (42, 43). Further work is necessary to define the signaling mechanisms underlying this response.

We conclude that the ability of *S. liquefaciens* to survive at room temperature or under unfavorable environmental conditions (low temperatures and reduced nutrient levels) and the variability in biofilm formation among *S. liquefaciens* isolates may contribute to the risk for human infection posed by certain strains. Therefore, a better understanding of the adherence properties of this species will provide greater insights into the diseases it causes.

ACKNOWLEDGMENTS

S.R.-M. and M.L.-D. hold a contract from the Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). J.R.-V. holds a Miguel Servet contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (grants CP08/00100 and PS09/00466). J.M.I. was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (grant CGL2008-04559/BOS). A.O. is supported by the Fundación Ramón Areces (grant CIVP16A1814).

We thank Tomohiro Morohoshi for kindly providing the VIR24 strain and Fidel Madrazo (Electron Microscopy Unit, Technology Support Services, IDIVAL) for help with TEM and CLSM.

REFERENCES

- Arslan U, Erayman I, Kirdar S, Yuksekkaya S, Cimen O, Tuncer I, Bozdogan B. 2010. *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Int* 52:208–212. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-200X.2009.02934.x>.
- Chemaly RF, Rathod DB, Raad II. 2009. A tertiary care cancer center experience of the 2007 outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infection due to prefilled syringes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:1237–1238. <http://dx.doi.org/10.1086/648661>.
- Ramírez-Arcos S, Chin-Yee I, Hume H, Fearon M, Goldman M, Eckert K, Martincic I, Peters G, Kovach D, Richardson SE. 2006. Fatal septic shock associated with transfusion-transmitted *Serratia marcescens*. *Transfusion* 46:679–681. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00783.x>.
- Voelz A, Müller A, Gillen J, Le C, Dresbach T, Engelhart S, Exner M, Bates CJ, Simon A. 2010. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management. *Int J Hyg Environ Health* 213:79–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2009.09.003>.
- Engelhart S, Saborowski F, Krakau M, Scherholz-Schlosser G, Heyer I, Exner M. 2003. Severe *Serratia liquefaciens* sepsis following vitamin C infusion treatment by a naturopathic practitioner. *J Clin Microbiol* 41:3986–3988. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.8.3986-3988.2003>.
- Fitzgerald P, Drew JH, Kruszelnicki I. 1984. *Serratia*: a problem in a neonatal nursery. *Aust Paediatr J* 20:205–207.
- Grohskopf LA, Roth VR, Feikin DR, Arduino MJ, Carson LA, Tokars JJ, Holt SC, Jensen BJ, Hoffman RE, Jarvis WR. 2001. *Serratia liquefaciens* bloodstream infections from contamination of epoetin alfa at a hemodialysis center. *N Engl J Med* 344:1491–1497. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200105173442001>.
- Mossad SB. 2000. The world's first case of *Serratia liquefaciens* intravascular catheter-related suppurative thrombophlebitis and native valve endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 6:559–560. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00164.x>.
- Pinna A, Usai D, Sechi LA, Carta A, Zanetti S. 2011. Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmol* 89:382–387. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01689.x>.
- Roth VR, Arduino MJ, Nobiletti J, Holt SC, Carson LA, Wolf CF, Lenas BA, Allison PM, Jarvis WR. 2000. Transfusion-related sepsis due to *Serratia liquefaciens* in the United States. *Transfusion* 40:931–935. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40080931.x>.
- Martincic I, Mastronardi C, Chung A, Ramírez-Arcos S. 2008. Unexplained agglutination of stored red blood cells in Alsever's solution caused by the gram-negative bacterium *Serratia liquefaciens*. *Immunohematology* 24:39–44.
- Traub WH. 2000. Antibiotic susceptibility of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens*. *Chemotherapy* 46:315–321. <http://dx.doi.org/10.1159/000007304>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005>.
- Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 186:692–698. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.3.692-698.2004>.
- Van Houdt R, Givskov M, Michiels CW. 2007. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev* 31:407–424. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00071.x>.
- Espinal P, Marti S, Vila J. 2012. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect* 80:56–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2011.08.013>.
- Trampuz A, Widmer AF. 2006. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis* 19:349–356. <http://dx.doi.org/10.1097/01.qco.0000235161.85925.e8>.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39:309–317. <http://dx.doi.org/10.1086/421946>.
- Vickery K, Deva A, Jacombs A, Allan J, Valente P, Gosbell IB. 2012. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 80:52–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2011.07.007>.
- Donlan RM. 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7:277–281. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0702.010226>.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143(Part 12):3703–3711. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>.
- Someya N, Morohoshi T, Okano N, Otsu E, Usuki K, Sayama M, Sekiguchi H, Ikeda T, Ishida S. 2009. Distribution of *N*-acylhomoserine lactone-producing fluorescent pseudomonads in the phyllosphere and rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Microbes Environ* 24:305–314. <http://dx.doi.org/10.1264/jisme.2.ME09155>.
- Vivas J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Naharro G, Villena A. 2004. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine. *Vet Microbiol* 101:167–176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.003>.
- Romero M, Muras A, Mayer C, Bujan N, Magarinos B, Otero A. 2014. In vitro quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. *Dis Aquat Organ* 108:217–225. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02697>.
- Milton DL, Chalker VJ, Kirke D, Hardman A, Camara M, Williams P. 2001. The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and *N*-hexanoylhomoserine lactone. *J Bacteriol* 183:3537–3547. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.12.3537-3547.2001>.
- O'Toole GA, Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28:449–461. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>.
- Padilla D, Acosta F, Garcia JA, Real F, Vivas JR. 2009. Temperature influences the expression of fimbriae and flagella in *Hafnia alvei* strains: an

- immunofluorescence study. *Arch Microbiol* 191:191–198. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-008-0442-y>.
28. Moons P, Van Houdt R, Aertsen A, Vanoirbeek K, Engelborghs Y, Michiels CW. 2006. Role of quorum sensing and antimicrobial component production by *Serratia plymuthica* in formation of biofilms, including mixed biofilms with *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 72:7294–7300. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01708-06>.
 29. Wei JR, Lai HC. 2006. *N*-Acylhomoserine lactone-dependent cell-to-cell communication and social behavior in the genus *Serratia*. *Int J Med Microbiol* 296:117–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.033>.
 30. Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, Ianieri A. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol* 104:1552–1561. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>.
 31. Marti S, Rodríguez-Baño J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, Dé E. 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes* 4:5. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-4-5>.
 32. Vivas J, Padilla D, Real F, Bravo J, Grasso V, Acosta F. 2008. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet Microbiol* 129:150–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.007>.
 33. Labbate M, Zhu H, Thung L, Bandara R, Larsen MR, Willcox MD, Givskov M, Rice SA, Kjelleberg S. 2007. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol* 189:2702–2711. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01582-06>.
 34. Shanks RM, Stella NA, Kalivoda EJ, Doe MR, O'Dee DM, Lathrop KL, Guo FL, Nau GJ. 2007. A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation. *J Bacteriol* 189:7262–7272. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00859-07>.
 35. Schembri MA, Klemm P. 2001. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel FimH variants and ramifications for virulence. *Infect Immun* 69:1322–1328. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.3.1322-1328.2001>.
 36. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol* 10:179. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>.
 37. Bayliss CD. 2009. Determinants of phase variation rate and the fitness implications of differing rates for bacterial pathogens and commensals. *FEMS Microbiol Rev* 33:504–520. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00162.x>.
 38. Snyder JA, Lloyd AL, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HL. 2006. Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infect Immun* 74:1387–1393. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.2.1387-1393.2006>.
 39. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun* 76:4055–4065. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00494-08>.
 40. van der Woude MW, Bäuml AJ. 2004. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17:581–611. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.17.3.581-611.2004>.
 41. Lai HC, Soo PC, Wei JR, Yi WC, Liaw SJ, Horng YT, Lin SM, Ho SW, Swift S, Williams P. 2005. The RssAB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *J Bacteriol* 187:3407–3414. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.10.3407-3414.2005>.
 42. Greco-Stewart VS, Brown EE, Parr C, Kalab M, Jacobs MR, Yomtovian RA, Ramirez-Arcos SM. 2012. *Serratia marcescens* strains implicated in adverse transfusion reactions form biofilms in platelet concentrates and demonstrate reduced detection by automated culture. *Vox Sang* 102:212–220. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01550.x>.
 43. Greco CA, Zhang JG, Kalab M, Yi QL, Ramirez-Arcos SM, Gyongyossy-Issa MI. 2010. Effect of platelet additive solution on bacterial dynamics and their influence on platelet quality in stored platelet concentrates. *Transfusion* 50:2344–2352. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02726.x>.

