

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S. C.

---

**Programa de Estudios de Posgrado**

PARTICIPACION DE LAS MOLECULAS SEÑAL  
ACILO HOMOSERINA LACTONA, EN LA  
MOVILIDAD SWARMING EN *VIBRIO SPP*, AISLADA  
DE RAICES DEL MANGLE NEGRO *AVICCEZIA*  
*GERMINANS*

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestría en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

**Alfonso Dávila Lule**

**La Paz, Baja California Sur., Agosto de 2007**

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 29 del Mes de Agosto del 2007, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**“Participación de las moléculas señal acilo homoserina lactona en la movilidad swarming en *Vibrio spp*, aislada de raíces del mangle negro, *Avicennia germinans*”**

Presentada por el alumno:

**Alfonso Dávila Lule**

---

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

---

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



---

Dra. Gina Holguin Zefhuss  
DIRECTORA DE TESIS

---

Dr. C. Humberto Mejía Ruíz  
CO-TUTOR



---

Dr. Fabio Lopes Olivares  
CO-TUTOR

---

**DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## **COMITÉ TUTORIAL**

Dra. Gina Holguín Zehfuss

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, La Paz, B.C.S.

Dr. C. Humberto Mejía Ruiz

Co-tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, La Paz, B.C.S.

Dr. Fabio Lopes Olivares

Co-tutor

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rió de Janeiro, Brasil.

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dra. Gina Holguín Zehfuss

Dr. C. Humberto Mejía Ruiz

Dr. Fabio Lopes Olivares

## **MIEMBROS DEL JURADO DEL EXAMEN DE GRADO**

Dr. C. Humberto Mejía Ruiz

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez

Dra. Maria Esther Puente

Suplente: Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes

## RESUMEN

En la comunicación celular en bacterias, la utilización de moléculas señales o autoinductores, permite la regulación de ciertos procesos fisiológicos dentro de una población bacteriana, cuando se alcanza cierta densidad poblacional, presentándose un fenómeno conocido como quórum sensing. En bacterias gram-negativas, la producción del autoinductor acilo homoserina lactona (AHL) interviene en la regulación de genes relacionados en producción de antibióticos, factores de virulencia, transferencia de plásmidos y en un tipo de desplazamiento coordinado, conocido como swarming o enjambre. El desplazamiento swarming, es un tipo de movilidad que presentan las bacterias en ambientes semisólidos, donde intervienen, tanto una modificación morfológica (aumento de tamaño celular y producción de múltiples flagelos laterales), como la producción de sustancias, conocidas como biosurfactantes, que ayudan a romper la tensión superficial. Se ha reportado en bacterias patógenas de animales, que las AHLs están relacionadas en la producción de biosurfactantes, permitiendo colonizar tejidos. Sin embargo, se desconoce la presencia de este desplazamiento en bacterias aisladas de raíces de plantas. *Vibrio* LR6HC, es una bacteria que se aisló de raíces del mangle negro, y por sus características, es una potencial promotora de crecimiento en plantas. Se detectó la producción de las moléculas señal, 4C, 6C y 8C-HL en base a la ayuda de biosensores bacterianos, cromatografía de capa fina (TLC) y espectrometría de masas (GM/SM). Además, se observó que la bacteria presentaba movilidad swarming en 3 diferentes medios semisólidos, con diferentes fuentes nutricionales, llegando a detectarse diferentes tipos de movilidad, dependiendo del medio donde se desplace. Para relacionar la regulación de las AHL en el desplazamiento swarming, se realizó una anulación de la producción de la molécula señal, de una forma intercelular, en base a la acción de la enzima AiiA, una lactonasa que hidroliza el anillo lactona de la AHL, no permitiendo su unión con el regulador transcripcional. Se realizó una conjugación, entre cepa LR6HC y la cepa *E. coli*, la cual presentaba el plasmido pDSK519::*aiiA*. Se obtuvieron transconjugantes, y se realizó una búsqueda de aquellas que no producían AHLs, no detectadas por biosensores bacterianos y se comprobó por TLC y GM/SM. Se observó en los transconjugantes, la falta de movilidad swarming en los diferentes medios semisólidos y se comprobó por microscopía electrónica de barrido y transmisión, que la morfología de la célula no presentaba modificaciones en su tamaño, ni en sus estructuras celulares. Se observó que las células en situación de desplazamiento swarming, tenían un tamaño de hasta 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentando múltiples flagelos laterales y detectando la presencia de una sustancia o velo, que cubría por completo la migración de las bacterias. Se analizó, a través de métodos para detección y cuantificación de biosurfactante, que la cepa transconjugante presentaba una disminución marcada en la producción de una sustancia que puede comportarse como agente tenso activo. Además, se detectó una disminución de hasta un 60%, por parte de la cepa transconjugante no productora de AHLs, en la producción de biopelículas, las cuales están relacionadas con la producción de biosurfactantes, en *Pseudomonas aureoginosa* y *Burkholderia cepacia*. En conclusión, la producción de las moléculas señal AHLs, en la cepa *Vibrio* LR6HC permitiendo la regulación del desplazamiento swarming, haciendo que la bacteria adquiriera una transformación morfológica que le permita migrar sobre superficies semisólidas, a través de la producción de una sustancia que actué rompiendo la tensión superficial, comportándose como un biosurfactante bacteriano.

Palabras clave: Quórum sensing, AHLs, swarming, *Vibrio*, biosurfactantes,

## ABSTRACT

In bacterial cell-cell communication, the use of molecular signals or autoinducers allows the regulation of physiological processes known as quorum sensing, when certain population density is reached within a bacterial population. In gram-negative bacteria, the production of acyl homoserine lactone (AHL) autoinductor takes part in the regulation of genes related in production of antibiotics, virulence factors, transference of plasmids and a type of coordinated migration, known as swarming. The swarming motility in bacteria, is observed in semisolid condition, in which the bacteria present a morphologic modification (increase of cellular size and lateral flagellum production), and the production of substances, known as biosurfactants, that help to break the superficial tension. Works with pathogenic bacteria in animals, reported that the AHLs were related in the production of biosurfactants, that allowed the colonization in the tissue. Nevertheless, this motility in bacteria isolated from roots of plants is not reported. The bacteria *Vibrio* strain LR6HC, isolated from roots of mangle black, with a promotional potential of growth in plants, showed molecular signals 4C, 6C and 8C-HL on the base of the techniques bacterial biosensors, thin layer chromatography(TLC), and spectrometry of masses (GM/SM). In addition, it was observed that the bacterium presented swarming motility in 3 different semisolids means, with different nutrition sources, getting to detect different types from motility, depending on means where one moves. In order to relate the regulation of the AHL in the swarming motility, was made a cancellation of the production of the molecule signal, of an intercellular form, on the basis of the action of enzyme AiiA, one lactonasa that hidrolize the lactone ring of the AHL, not allowing its union with the transcriptional regulator. It was made a conjugación, between stock LR6HC and the stock and *E. coli*, which presented/displayed pDSK519::*aiiA* plasmid. Transconjugants were obtained, and a search was made of which they did not produce AHLs, not detected by bacterial biosensors and it was verified by TLC and GM/SM. It was observed in the transconjugants, the lack of motility swarming in different means semisolids and one verified by electronic microscopy of sweeping and transmission, that the morphology of the cell did not present modifications in its size, nor in its cellular structures. It was observed that the cells in displacement situation swarming, had a size of up to 2  $\mu\text{m}$  of diameter, presenting multiple lateral flagella and detecting the presence of a substance or veil, that completely covered the migration with the bacteria. It was analyzed, through methods for detection and quantification of biosurfactants, that the transconjugant stock presented/displayed a diminution marked in the production of a substance that can behave like active tense agent. In addition, I detect a diminution of until a 60%, on the part of the nonproducing stock transconjugant of AHLs, in the production of biofilms, which are related to the biosurfactants production in *Pseudomonas aureoginosa* and *Burkholderia cepacia*. In conclusion, the production of AHLs signal, in the stock *Vibrio* LR6HC allowing the regulation of the swarming motility, causing that the bacterium acquires a morphologic transformation that allows him to migrate on surfaces semisolids, through the production of a substance which I acted breaking the superficial tension, behaving like a bacterial biosurfactant.

Key words; Quorum sensing, AHLs, swarming, *Vibrio*, biosurfactant.

*.....y sintetizó una molécula señal, la cual captamos todos los que estábamos a su alrededor, ingresando en cada uno de nosotros y logrando que sintetizáramos, al igual que ella, la misma molécula. Juntos, alcanzamos un determinado quórum. Aunque tuvimos que migrar hacia ambientes diferentes, nunca olvidamos aquella molécula señal que nos activo.*

*Dedicado a la memoria de la  
Dra. Gina Holguín Zehfuss*

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Sr. Alfonso Dávila Carreón y Sra. Audelia Lule de Dávila, por su amor, cariño, comprensión y por dejarme partir a esta aventura que tanto a ustedes como a mi, nos costo tanto. Los amo infinitamente.*

*A mis hermanos, Javier, Jhonny, Mario, José Alfredo, Jorge, Angélica, Teresa, que me vieron partir al igual que mis padres, que me esperaron con un abrazo 2 veces por año, y que siempre me recordaron con cariño. Los amo carnales.*

*A mis tíos Julián Dávila y Guadalupe Lule y mis primos hermanos, Perla, Roció, Julián, Alejandro, que siempre me recibieron con amor y cariño, y que junto a mi familia, formamos los Davila Lule, si señor!*

*A la señora Ada Silvia Carrillo, por darme ánimos y hacerme sentir en casa, por su motivación y amor. La quiero infinitamente.*

*Al amor de mi vida, Viviana Alethya Carrillo y Carrillo, por la que estoy aquí en este momento, a la que amo con toda mis fuerzas y que siempre estaré a su lado.*

*A la Dra. Gina Holguín Zehfuss, que me dio la oportunidad de ser investigador y que con su paciencia, entereza, regaños y un infinito cariño, compartió conmigo, el bello mundo de la microbiología. Doctora, la amo y la extraño muchísimo.*

*Y por ultimo Dios, que me cuidó, amó y dejó llegar hasta este momento. Eres grande.*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera logrado, sin la contribución de muchas personas que estuvieron hasta el último momento para que se llevara a cabo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca-crédito con registro 191068. Al proyecto 022C “Estudio de la codependencia y comunicación entre miembros de la comunidad bacteriana de la rizosfera y árboles de mangle para el diseño de inoculantes mixtos que promuevan el crecimiento de plantas”.

A mis asesores de tesis: Dra. Gina Holguín por ser alguien especial, al Dr. Humberto Mejía, por sus correcciones tan atinadas y su infinita amistad, al Dr. Fabio Lopes, por su estancia en Brasil, sus correcciones y ese saludo entrañable. Así mismo, también quiero agradecer al Dr. Roberto C. Vázquez y a la Dra. M. Esther Puente, por revisar mi tesis, por ser jurado en el examen de grado y por su amistad.

A la Dra. Guadalupe Espin, Dr. Daniel Segura y Dr. Cinthia Nuñez, del IBT, UNAM; Dr. Claudio Retamal, Dr. Joseph Medeiros de UENF, Brasil; Dr. Alberto Mendoza del CBG, IPN. Por atenciones, colaboración y por sus muestras de cariño, muchísimas gracias. Al Dr. W. Bauer, por cedernos cepas bacterianas de gran utilidad, y sus atenciones. Al Dr. Anathol Eberhard, por su análisis de GM/SM y sus atenciones.

Ariel Cruz, por su amistad y contribución en la parte de microscopía electrónica; Delia Rojas, por su ayuda en la parte de biología molecular; M.C Manuel Moreno, por su ayuda y amistad; M.C. Ángel Carrillo, por su amistad y colaboración.

A las autoridades de Posgrado, por gestionar el apoyo necesario para este estudio. Dra. Thelma, Lic. Osvelia, Lic. Lety, Bety y Claudia, Horacio y Manuel por ayudarme en todo lo humanamente posible para que pudiera cumplir este objetivo.

Al Grupo de Microbiología Ambiental, a cargo del Dr. Yoav Bashan, por facilitarme las instalaciones y los equipos para desarrollar esta tesis.

A todos mis compañeros del grupo de microbiología ambiental, especialmente a todos los amigos que formamos parte aquel grupo de microbiología de manglar: Annie, Manuel, Claudia, Yossef, Javier, Tania y Paty. Pasamos grandes momentos en nuestro laboratorio, los cuales quedaron grabados en cada uno de nosotros, alegrías, risas, enojos. Sin duda, el mejor grupo de investigación.

A mis los mejores amigos que pude haber encontrado en este lugar: Grecia, Erika, Marisol, Gastón, Rodolfo, Salvador, Flavio, Gustavo, Fernando, Héctor, María Elena, Keny, Hugo, Crisalejandra, Cristy, Cesar, Adán, “Burro”, Carlitos, Jorge.

A mis grandes amigos, hermanos del alma, que siempre me esperaron cada invierno o cada verano para darme ese abrazo calido y darme ánimos: Alejandro, Roberto, Robertillo, Laura, Lucia, Alain, Nestor, Marco, “Alex-Guama”, Ángel, Ramiro.

En general a las personas que me han atendido y brindado su amistad durante mi estancia en el CIBNOR pero que en este momento escapan de mi memoria.

## CONTENIDO

CAPITULO	TEMA	PAGINA
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
	1.1. Comunicación celular: quórum sensing.....	1
	1.2. Sistemas de comunicación mediadas por QS.....	3
	1.2.1. Sistema LuxR/I.....	3
	1.2.1.1. Sintomas de la familia LuxI.....	4
	1.2.1.2. Reguladores transcripcionales de la familia LuxR.....	5
	1.3. Swarming.....	6
	1.3.1. Etapas del fenómeno swarming.....	8
	1.3.1.1. Diferenciación de células vegetativas en las células swarmer.....	8
	1.3.1.2. Migración de las poblaciones de células swarmer.....	8
	1.3.1.3. Proceso de consolidación de células swarmer.....	8
	1.3.2. Factores responsables del desplazamiento swarming.....	9
	1.3.2.1. Flagelos.....	9
	1.3.2.2. Quimiotaxis.....	10
	1.3.2.3. El biosurfactante extracelular (Limo).....	11
	1.3.3. Rutas reguladoras del movimiento swarming).....	11
	1.3.3.1. Sistema principal flagelar y diferenciación celular.....	12
	1.3.3.2. El Sistema Quórum Sensing.....	13
	1.3.4. Diferencias bioquímicas entre células swarmer y células vegetativas.....	14

1.3.5. Inhibición de la movilidad swarming.....	15
1.3.5.1 Técnicas que restringen físicamente	
la movilidad swarming.....	15
1.3.5.1.1. Recubrimientos de agar.....	15
1.3.5.1.2. Humedad superficial reducida.....	16
1.3.5.1.3. Inhibidores del crecimiento.....	16
1.3.5.1.4. Inhibición de la función flagelar .....	16
1.3.5.2. Moléculas inhibidoras de la movilidad swarming.....	17
1.3.5.2.1. Diketopiperazinas.....	17
1.3.5.2.2. Furanonas.....	18
1.3.5.2.3 AHL mímicas producidas por plantas.....	19
1.3.5.2.4. Actividad Enzimática.....	20
1.4. Ecosistemas de manglar.....	21
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>22</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Objetivo General.....	32
4.2 Objetivos Particulares.....	32
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
6.1. DETECCIÓN DE AHL.....	33
6.1.1. Pruebas presuntivas de producción de AHL.....	33
6.1.2. Extracción de AHLs.....	33
6.1.3. Identificación de AHLs por cromatografía en	
capa fina (TLC) .....	34

6.1.4. Identificación de AHL por espectrometría de masas.....	35
6.2. DETECCION DE MOVILIDAD SWARMING.....	36
6.2.1. Detección de desplazamiento swarming en placa petri.....	36
6.2.2. Microscopia electrónica de Barrido (SEM).....	36
6.2.3. Microscopia electrónica de Transmisión (TEM) .....	37
6.2.4. Efecto de las AHL sintéticas en el swarming de <i>Vibrio</i> LR6HC.....	38
6.3. Método de detección de biosurfactante-prueba de gota de agua.....	38
6.4. Extracción de Biosurfactante.....	38
6.4.1. Formación de Biopelículas.....	39
6.5. Alteración en producción de AHLs.....	39
6.5.1. Conjugación.....	39
6.5.2. Extracción de DNA plasmidico.....	41
6.5.3. PCR del gen <i>aiiA</i> .....	42
6.5.4. Curva de crecimiento de cepa silvestre y modificada de <i>Vibrio</i> LR6HC.....	42
6.6. EFECTO DE LA ANULACION EN PRODUCCION DE AHL EN VIBRIO LR6HC.....	43
6.6.1. Producción de AHL en transconjugantes de <i>Vibrio</i> LR6HC.....	43
6.6.2. Detección de movilidad swarming en transconjugantes de <i>Vibrio</i> LR6HC.....	43
6.6.3. Detección y extracción de biosurfactante en transconjugantes de <i>Vibrio</i> LR6HC.....	43

6.6.4. Efecto en la movilidad swarming del extracto de cepa silvestre en transconjugantes de <i>Vibrio</i> LR6HC.....	44
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
7.1 DETECCIÓN DE AHL .....	45
7.1.1 Prueba presuntiva de producción de AHL.....	45
7.1.2 Extracción de AHL .....	46
7.1.3 Identificación de AHLs por cromatografía en capa fina (TLC) .....	47
7.1.4 Identificación de AHL por espectrometría de masas.....	48
7.2 DETECCIÓN DE MOVILIDAD SWARMING EN <i>VIBRIO</i> LR6HC.....	48
7.2.1 Detección de desplazamiento swarming en placa petri.....	48
7.2.2 Microscopia electrónica de Barrido (SEM).....	51
7.2.3 Microscopia electrónica de Transmisión (TEM) .....	52
7.2.4 Efecto de las AHL sintéticas en el swarming de <i>Vibrio</i> LR6HC .....	54
7.3 ALTERACIÓN EN PRODUCCIÓN DE AHLS .....	55
7.3.1 Obtención transconjugantes.....	55
7.3.2 Extracción de DNA plasmídico y PCR de gen <i>aiiA</i> .....	56
7.3.3 Curvas de crecimiento .....	56
7.3.4 Efecto de la enzima <i>AiiA</i> en la producción de AHLs .....	58
7.3.4.1. Prueba presuntiva de producción de AHL en <i>Vibrio</i> LR6HC <i>aiiA</i> .....	58
7.3.4.2. Extracción de AHLs e identificación en cromatografía de capa fina (TLC).....	58

7.3.4.3. Detección de producción de AHL por espectrometría de masas.....	59
7.3.5. Efecto de la enzima AiiA en desplazamiento swarming.....	59
7.3.5.1. Desplazamiento swarming en <i>Vibrio</i> LR6HC <i>aiiA</i> .....	59
7.3.5.2. Microscopia electrónica de Barrido (SEM) .....	61
7.3.5.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	61
7.3.5.4. Detección de biosurfactante-prueba de la gota de agua.....	62
7.3.5.5. Detección de Biopelículas formadas por <i>Vibrio</i> LR6HC.....	63
7.3.5.6. Extracción de Biosurfactante en <i>Vibrio</i> LR6HC.....	63
7.3.5.7. Efecto del extracto de la cepa <i>Vibrio</i> LR6HC en la movilidad de LR6HC <i>aiiA</i> .....	64
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
8.1 Identificación de AHLs .....	66
8.2 Detección de movilidad swarming.....	70
8.3 Anulación de la producción de AHLs.....	73
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>X. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
1	Producción de AHL en <i>Vibrio</i> LR6HC .....	46
2	Detección de AHL en extractos de <i>Vibrio</i> LR6HC utilizando biosensores ....	46
3	Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de <i>Vibrio</i> LR6HC ... ..	47
4	Caracterización de la molécula 4C-HSL por GM/SM.....	49
5	Desplazamiento swarming observado en <i>Vibrio</i> LR6HC .....	51
6	Microscopia electrónica de Barrido en colonias de <i>Vibrio</i> LR6HC .....	52
7	Preparaciones semifinas para TEM .....	54
8	Microscopia electrónica de Transmisión en colonias de <i>Vibrio</i> LR6HC .....	54
9	Efecto de AHLs sintéticas en <i>Vibrio</i> LR6HC .....	55
10	Amplificación por PCR del gen <i>aiiA</i> .....	57
11	Curva de crecimiento de <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	57
12	Detección de AHL en placas en <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	58
13	Cromatografía de capa fina de AHLs de <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	59
14	Ausencia de AHL en <i>Vibrio</i> LR6H <i>caiiA</i> por GM/SM .....	60
15	Diferencias en desplazamiento swarming en <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> ....	61
16	Microscopia electrónica de barrido <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	62
17	Microscopia electrónica de transmisión <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	62
18	Prueba de la gota pendiente en <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	63
19	Cuantificación de biopelículas en <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	64
20	Cuantificación de biosurfactante en <i>Vibrio</i> LR6HC y LR6H <i>caiiA</i> .....	65
21	Efecto de AHLs en cepa modificada de <i>Vibrio</i> LR6H <i>caiiA</i> .....	65

## **I. INTRODUCCION**

### **1.1. Comunicación celular: quórum sensing**

Aunque clásicamente se ha considerado que los microorganismos del suelo se comportan como individuos aislados incapaces de relacionarse entre ellos, se ha demostrado su habilidad para percibir las condiciones ambientales que les rodean y comunicarse entre ellos mediante compuestos químicos o autoinductores (AIs), los cuales son difusibles y permeables a través de la membrana celular, siendo liberados al ambiente. Conforme aumenta la densidad celular de la población, el AI se acumula hasta alcanzar una concentración determinada, donde se incorpora de nuevo al interior de la célula interaccionando con proteínas activadoras de la transcripción que, a su vez, inducen la expresión de los genes específicos que regulan. Este mecanismo permite a los microorganismos coordinar su comportamiento ya que, debido a los cambios continuos que se producen en el medio, necesitan reaccionar de manera rápida para adaptarse a estos cambios y sobrevivir. Al sistema de comunicación célula-célula que emplea los AIs producidos en respuesta a la densidad celular de la población de microorganismos, se le ha denominado “Quórum Sensing” (QS) (Keller y Surette, 2006).

Los sistemas de regulación que funcionan como mecanismos de comunicación intercelular dependientes de QS se han identificado en diversos microorganismos. En todo los casos, controlan funciones de comportamiento o fisiológicas muy diversas, entre ellas como bioluminiscencia, transferencia de plásmidos por conjugación, producción de antibióticos y bacteriocinas, expresión de genes de la rizosfera, producción de polisacárido, etc. Todas estas funciones tienen un común que solo se ejecutan si el número de células de la población del microorganismo es lo suficientemente alto como para asegurar el éxito del proceso (Fuqua *et al*, 1994)

Los fenómenos de autoinducción se describieron por primera vez en la bacteria simbiótica marina *Vibrio (Photobacterium) fischeri* para explicar la generación de bioluminiscencia en el interior de los órganos especializados que poseen algunas especies de peces y calamares con los que se asocia. En *V. fischeri*, la emisión de luz esta controlada por las proteínas LuxR y LuxI. LuxI es una lactona sintetasa que interviene en la producción de 3-oxo-N-(tetrahidro-2-oxo3-furanyl) hexanamida, o mas comúnmente conocido como N-3-(oxohexanoyl) homoserina lactona o 3O, C6-HSL, que al alcanzar un nivel adecuado de concentración, se une a LuxR, una proteína reguladora que, a su vez, activa la trascrición de los genes del operon *luxCDABE* dando lugar al fenómeno de bioluminiscencia. Este fenomeno en el interior del calamar protege a *V. fischeri* del ataque de sus depredadores naturales. (Visick y Mc Fall-Ngai, 2000).

La regulación de los genes mediada por AHL originalmente fue llamada “autoinducción” por dos razones: primero porque el operón *lux* de *V. fischeri* es regulado a sí mismo positivamente por la AHL y segundo porque cada especie bacteriana se creía originalmente que producía una señal única de AHL (Engebrecht, *et al.* 1983).

El QS mediado por AHL parece ser mas extensa entre los Proteobacteria (Greenberg *et al.*, 2003). Además de LuxR/I, se han descrito otros mecanismos de QS, entre ellos los sistemas LuxM/AI-1 y LuxS/AI-2, típicos de bacterias Gram negativas. Por su parte, en bacterias Gram positivas, los sistemas QS se caracterizan porque sus AIs son péptidos modificados. Además se han encontrado, aunque con menor frecuencia, otras moléculas que pueden actuar como autoinductores, tales como 4-quinolonas, diketopiperazinas, ácido metil-dodecanoico, furanosil borato, tiolactona

cíclica, ácido farnesoico, ácido palmítico, etc. (Shiner *et al*, 2004; Zhang y Dong, 2004; Winans y Brentic, 2005; Rodelas *et al*, 1999).

## **1.2. Sistemas de comunicación mediadas por QS**

### **1.2.1. Sistema LuxR/I**

El mecanismo de QS, como se ha indicado, se describió por primera vez en *V. fischeri* para explicar la emisión de luz o bioluminiscencia por esas bacterias, lo que se debe a la expresión de los genes *lux* responsables. Desde entonces se ha descrito en otros microorganismos y, en todos los casos, está constituido por un elemento regulador y una molécula autoinductora (Reading y Sperandio, 2006).

Los genes *lux* se organizan en dos unidades transcripcionales divergentes, separadas aproximadamente por 155 pares de bases. Una de ellas contiene siete genes que forman el operon *luxICDABEG*, y el otro solo posee el gen *luxR*. El producto de *luxI* es una homoserina lactona sintasa que interviene en la síntesis del AI 6C-HL y el producto de *luxR* funciona como un activador transcripcional del operon *luxICDABEG*. Por lo tanto, LuxR cubre tanto la función de sensor/traductor de la señal como la de regulador de la respuesta a la misma (Rodelas *et al*, 1999).

A bajas densidades celulares de la población de *V. fischeri*, la transcripción de *luxICDABEG* y de *luxR* es escasa, aunque suficiente para que se mantenga una concentración basal de LuxR y de LuxI. Conforme aumenta la densidad celular, el AI 3-oxo-C6-HL se acumula en el interior celular y se libera al medio circundante. Cuando la concentración externa del AI alcanza un nivel umbral, el AI pasa de nuevo al interior de la célula y se une a LuxR, que se dimeriza. Una vez activada, la unión de LuxR a una secuencia palindrómica de 20 pares de bases, denominada caja *lux*, de la región promotora de *luxI* incrementa la transcripción de *luxICDABEG*, lo que origina un

importante aumento de luz emitida. El incremento de la luz esta controlada por el complejo LuxR-AI que a su vez, regula negativamente la transcripción de *luxR*, dando lugar a una disminución de LuxR.

### 1.2.1.1 Sintetas de la familia LuxI

Las proteínas sintetas de la familia LuxI catalizan la unión de S-adenosilmetionina (SAM) con una acil proteína transportadora de acilos (acil-ACP), o lo que es lo mismo la unión de un grupo homoserina lactona derivado del metabolismo de los aminoácidos, y una cadena acilo lateral derivada del metabolismo de los ácidos grasos, que son los dos componentes de la AHL resultante. A partir de esta base se genera diferentes AHLs caracterizadas por la longitud de su cadena acilo lateral generalmente de 4-12 carbonos, aunque se han descrito AHLs con cadenas de hasta 18 carbonos, el tipo de sustituyentes en el carbono C3, que puede ser carbonilo, hidroxilo, o totalmente reducido; y la presencia de enlaces insaturados (Rodelas *et al*, 1999).

La acumulación de AHLs en el medio depende tanto de su liberación al medio como de una serie de factores ambientales. Un elevado pH o la presencia de lactonasas y/o acilasas pueden disminuir el número de AHLs disponibles para activar a LuxR. El carácter difusible de los AHLs depende del tamaño de su cadena carbonada. Las de cadena corta, esto es, de menos de 8 átomos de carbono difunden libremente a través de la membrana celular, mientras que AHLs de cadena larga necesitan transportadores de membrana que les permitan pasar de la célula al medio y de este al interior celular (Pearson *et al*, 1999).

Otras proteínas homólogas a LuxR y LuxI se han identificado en diferentes bacterias. Dichas proteínas están implicadas en la regulación por QS de fenotipos como la producción de antibióticos, factores de virulencia, exoenzimas y pigmentos,

transferencia de plásmidos y agregación celular, entre otros mecanismos regulados (Rodelas *et al*, 1999).

### **1.2.1.2. Reguladores transcripcionales de la familia LuxR**

Los reguladores transcripcionales de la familia LuxR se caracterizan por presentar en su extremo N-terminal un dominio de unión a AHLs, que intervienen en la oligomerización de la proteína, y un dominio hélice-giro-hélice de unión al DNA en la región C-terminal. Ambos dominios implican a LuxR como regulador transcripcional.

La unión de AHL a LuxR provoca su cambio conformacional y posterior dimerización. LuxR reconoce la caja *lux*, generalmente una secuencia palindrómica de 18 a 22 pares de bases que se localiza a 40 pares de bases de sitio de inicio de la transcripción de *luxI*. Una vez que LuxR se ha unido a la caja *lux*, se favorece la unión de la RNA polimerasa al promotor diana para activar la transcripción de los genes que regula. En general, el enlace de una AHL a su receptor requiere una concentración umbral de la señal (dependiendo del número de receptores, de células y del grado de difusión en el ambiente local) y descubrir probablemente, el dominio carboxilo-terminal de la proteína tipo LuxR que releva la inhibición. Esto permite al complejo del receptor-AHL unirse a las secuencias específicas del promotor en el genoma e inducir la expresión del gen. A menudo, los genes blanco, incluyendo homólogos de *luxI*, crean un circuito de regeneración positivo, a pesar de que existan sistemas en los cuáles el gen de la AHL sintetasa no está autorregulado (Throup, *et al*, 1995). El análisis del transcriptoma, también sugiere que la sincronización de la inducción de los genes controlados por quórum se realiza en forma continua (inducción temprano del crecimiento hasta la inducción durante la fase estacionaria) mientras que la sincronización no se relaciona con la concentración de la señal (Rodelas *et al*, 1999).

Por otro lado, se creía que el nivel de LuxR podría ser un desencadenador crítico para la expresión de los genes activados por QS. Además, de que las cajas lux no son evidentes en regiones del promotor de todos los genes regulados por QS (Pársek y Greenberg, 2000). En este aspecto, es interesante que un número de genes regulados por QS sean reguladores transcripcionales o miembros del sistema de dos componentes. Por consiguiente, los genes blanco de estos sistemas de dos componentes se pueden regular indirectamente vía la detección del quorum (Wagner *et al.* 2003). De igual forma, las proteínas de la familia LuxR pueden actuar como activadores, pero también como represores de la transcripción de sus genes diana.

### **1.3. Swarming**

Hasta hace pocos años, las bacterias eran consideradas como organismos unicelulares los cuales crecían y se multiplicaban independientemente de otras. Sin embargo, las bacterias pueden experimentar una diferenciación cuando estas crecen en colonias. Recientemente, varios sistemas de comunicación intercelulares han sido descubiertos, que indican que las bacterias son mucho más interactivas de lo que se había creído anteriormente y esta capacidad de comunicación se consideran esenciales para una actividad bacteriana coordinada (Sharma y Anand, 2002). Un ejemplo de este tipo de actividad, es un tipo de migración de poblaciones bacterianas, ocasionado por un fenómeno llamado swarming o salida en enjambre (Harshey, 1998).

El swarming o salida en enjambre es una forma especial de movilidad bacteriana en superficies, dependiente de la presencia de condiciones especiales en la que se encuentre dicha superficie. Esta movilidad es diferente de los otros cinco modos del desplazamiento superficial como lo son la natación (swimming), escurrimiento

(gliding), crisar (twitching) , resbalar (sliding) y lanzamiento (darting) (Harshey, 2003).

Los factores críticos que determinan si las células nadan o se diferencian en células swarmer (célula lista para desplazamiento swarming) y forme colonias regulares son la concentración de agar y viscosidad. En los medios que contienen concentraciones bajas de agar (menos de 0.4%), los organismos exhiben movilidad tipo natación, mientras que en medios que solidifican con 0.4-1.2% de agar (optimo a 0.7%), los organismos presentan movilidad swarming en la superficie del agar (Sharma y Anand, 2002). El aumento posterior en la concentración del agar en el medio, da como resultado una inhibición en la migración de organismos y por lo tanto forman colonias normales sin movilidad alguna. Las bacterias *Proteus*, *Vibrió* y ciertas especies de *Clostridium* pueden llegar a formar colonias swarmer en la superficie del agar solidificado al 2% (Harshey, 1994).

Desde 1885, Hauser describió fenómeno de la salida en enjambre en el género *Proteus*. Cuando las células de *Proteus* fueron inoculadas en la superficie del agar, las colonias se formaron en el punto de inoculación. Después de eso, las células en el borde de las colonias inician un proceso de diferenciación dando por resultado unas células largas, multinucleadas, sin división e hiperflageladas, las cuales experimentan ciclos de rápida y coordinada migración de la población a través de superficies sólidas. Siendo análogo a la salida en enjambre de abejas, El movimiento rápido hacia el exterior de las células swarming en el borde de las colonias swarmer se acompañan por un crecimiento bacteriano dentro de la colonia, dando por resultado una rápida colonización de toda la superficie disponible (Daniels *et al*, 2002)

El fenómeno de la salida en enjambre no se limita al género *Proteus*, también se ha demostrado en una amplia gama de bacterias. Todas las especies de bacterias que

producen swarming poseen flagelos peritricos, aunque también las células vegetativas pueden presentar flagelos polares o numerosos flagelos laterales (Allison y Hughes, 1991).

### **1.3.1. Etapas del fenómeno swarming**

Hay tres etapas bien definidas del movimiento swarming. Éstos incluyen la diferenciación de células vegetativas en células swarmer, migración de la población de células swarmer y consolidación.

#### **1.3.1.1. Diferenciación de células vegetativas en las células swarmer**

Cuando las células se inoculan en la superficie del agar, se forman inicialmente colonias de apariencia normal. Después, las células de la periferia o borde de la colonia experimentan diferenciación, dando lugar a células de forma alargada, multinucleada, sin septo de división y células de formas swarmer hiperflageladas, debido a la activación de la producción de flagelos y represión de la división de la célula (Allison y Hughes, 1991; Eberl *et al*, 1999).

#### **1.3.1.2. Migración de las poblaciones de células swarmer**

Este proceso implica el movimiento de células swarmer alargadas y altamente flageladas como grupos o avanzadas en la superficie del agar. Adicionalmente, el contacto célula-célula se observa que debe ser esencial para este tipo de migración. Ésta idea es reafirmada porque al aislar una célula en movimiento swarming, es incapaz de poder deslizarse por si sola en superficies del agar (Eberl *et al*, 1999).

#### **1.3.1.3. Proceso de consolidación de células swarmer**

Después de un período de la migración, las células swarmer experimentan consolidación, es decir reversión a flagelos normales (polares) y el cambio de tamaño a pequeñas células vegetativas. Estas células vegetativas son capaces de reiniciar otros ciclos de la diferenciación y migración de células swarmer, dando lugar a zonas

concéntricas en la superficie del agar (Allison y Hughes, 1991; Williams y Schwarzzoff, 1978) Sin embargo, diversos organismos demuestran diferentes patrones de consolidación como por ejemplo los mutantes de *Proteus mirabilis* y especies silvestres de otras especies bacterianas como *Clostridium sporogenes* y *Vibrio parahaemolyticus*, demostrando patrones de consolidación de apariencia fractal, mientras que en el caso de *Bacillus subtilis* y *Clostridium tetani*, no se observa zonas de consolidación (Allison *et al*, 1992: Jessica *et al*, 1992). No se sabe mucho sobre el mecanismo exacto de la consolidación, pero se ha encontrado que una metaloproteasa de 50kDa desempeña un papel importante en el swarming probablemente regulando la re-iniciación de la septación y la división celular durante este proceso (Allison y Hughes, 1991).

### **1.3.2. Factores responsables del desplazamiento swarming**

Diversos estudios se han realizado para determinar los factores responsables del swarming. Se ha encontrado que los flagelos, quimiotaxis y el limo extracelular juegan papeles importantes en este tipo de comportamiento (Allison *et al*, 1992: Jessica *et al*, 1992).

#### **1.3.2.1. Flagelos**

La movilidad swarming es conducida por un movimiento de flagelos de conformación peritrica que se piensan que funcionan como propulsores helicoidales conducidos por un motor rotatorio biológico (Hazelbauer *et al*, 1993). Dos formas de la célula existen que presentan dos diversas clases de movilidad; natación y salida en enjambre, dependiendo del tipo de superficie encontrado en el crecimiento. En medio líquido las bacterias son bastones pequeños con pocos flagelos y demuestran un clásico comportamiento de nado. Una vez creciéndolos en una superficie sólida (0.7-0.85% agar), se diferencian a formas elongadas, multinucleadas y flageladas que se desplazan

sobre las superficies del agar (Jessica *et al*, 1992). Los flagelos del nado y del movimiento en enjambre se componen de igual manera por la misma proteína flagelina. La interrupción del gene *lag* que codifica para la flagelina, suprime la natación y el movimiento en enjambre. Todos los mutantes negativos de flagelos (Fla-), desprovistos de flagelos y mutantes negativos de movilidad (Mot), son deficientes en nado y salida en enjambre, indicando la importancia de los flagelos. En otro caso, Che- mutante (deficientes en quimiotaxis) tienen natación por la presencia de los flagelos, pero no presentan ninguna salida en enjambre. Esto sugiere que un sistema intacto de quimiotaxis es también esencial para salida en enjambre, además de los flagelos (Hazelbauer *et al*, 1993).

### **1.3.2.2. Quimiotaxis**

Un sistema quimiotáctico funcional es esencial para el movimiento en forma de remolino que es característico de salida en enjambre.

Para explicar el fenómeno de swarming, la hipótesis de quimiotaxis negativa fue propuesta por Lominski y Lendrum, 1947 (citado por Sharma y Anand, 2002), también conocida como “la teoría de quimiotaxis negativa. Según esta teoría, células que crecen activamente y que se divide en la colonia central producen y excreta un metabolito tóxico el cual difunde en el agar y establece un gradiente el cual disminuye la concentración cuando más lejos este de la colonia. Cuando la concentración del metabolito alcanza un nivel crítico, estimula la formación de las células swarmer, inhibiendo la división de célula y estimulando la síntesis de los flagelos. Las células swarmer una vez formadas, detectan el producto tóxico, moviéndose lejos de la colonia central y bajo el gradiente en una respuesta quimiotáctica negativa. Una vez alcanzada un área de la placa donde está el nivel del metabolito bastante bajo, se detiene el

movimiento y las células swarmer se dividen para formar células de forma normal de bastones cortos. Estas células continúan creciendo y el ciclo se repite con una nueva generación de células swarmer emergentes del borde de la primera franja de avanzada y dando por resultado la formación de las zonas de consolidación sobre la superficie entera de la placa (Williams y Schwarzoﬀ, 1978).

### **1.3.2.3. El biosurfactante extracelular (Limo)**

En relación al tercer factor, se ha reportado que varias especies tales como *Proteus mirabilis*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Bacillus alvei* tienen la capacidad de producir un limo o viscosidad extracelular que ayuda a la migración de las células del enjambre sobre la superficie del agar. Las células swarmer de *P. mirabilis* producen una cantidad grande de este limo extracelular (polisacáridos ácidos) que forman una matriz entre células adyacentes, encapsulando la célula en agregados o montículos que fueron hechos para formar masas de células en migración. La presencia de compuestos extracelulares tales como los biosurfactantes o polisacáridos se producen para facilitar la salida en enjambre (Lindum *et al*, 1998).

### **1.3.3. Rutas reguladoras del movimiento swarming**

Recientemente, dos sistemas reguladores dominantes han sido identificados como responsables de la regulación del fenómeno de salida en enjambre (Givskov *et al*, 1998) Éstos son: cambios en rutas conformacionales, controlados por el sistema principal flagelar FlhD-FlhC y rutas biosintéticas, controlado por AHLs (*N*- acil L-homoserina lactonas) basadas en el sistema Quórum Sensing (Eberl *et al*, 1996).

### 1.3.3.1. Sistema principal flagelar y diferenciación celular

El gene principal flagelar *flhDC* codifica los reguladores transcripcionales Flh D y Flh C, que controlan la expresión de aproximadamente 50 genes relacionados con la estructura flagelar, quimiotaxis y división de célula (Eberl *et al*, 1999). Un mutante de los genes *flhDC* de *Serratia liquefaciens* MG1, desprovisto de flagelos, no puede presentar nado ni swarming. La expresión excesiva del gen *flhDC* en medio líquido indujo la diferenciación de la célula swarmer, dando por resultado la formación de células filamentosas, multinucleadas e hiperflageladas que son muy parecidas de las células swarmer que aislaron del borde de una colonia swarmer. Así, el estímulo artificial de la expresión del gen *flhDC* podía superar el requerimiento necesario del contacto superficial. Se indica claramente que la detección del contacto superficial es un estímulo importante para la diferenciación de la célula vegetativa en célula swarmer (primera etapa de la salida en enjambre) y es controlada por el operón *FlhDC*. Estudios recientes con *P. mirabilis* y *S. liquefaciens* demostraron que el operón principal de FlhDC era esencial para el comportamiento de la salida en enjambre en diversas bacterias (Eberl *et al*, 1996).

Todas las bacterias de la salida en enjambre poseen los flagelos peritricos, no obstante las células vegetativas del *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *Chromobacterium spp.* poseen flagelos polares. Las células vegetativas con flagelación polar de *V. parahaemolyticus* se transforman en células swarmer hiperflageladas y peritricas por limitación de hierro en el medio y en contacto con superficies sólidas. Los flagelos polares de *V. parahaemolyticus* actúan como sensor táctil, que detecta fuerzas que restringen el movimiento en superficie y medios altamente viscosos. Esto desencadena la expresión de genes específicos de la célula swarmer (genes *laf*) que

forman los flagelos laterales del swarming (Belas y Colwell, 1982; MacCarter y Silverman, 1998).

### 1.3.3.2. Sistema Quórum Sensing

El fenómeno de salida en enjambre (swarming) regulado por QS se presenta en una gama diversa de bacterias. La regulación del swarming por QS permite la óptima diseminación de células bacterianas cuando una población está alcanzando demasiada extensión para habitar un solo nicho (Whitehead *et al*, 2001). La disminución en la concentración de nutrientes pueden ocasionar que se presente la movilidad tipo swarming y la producción de biosurfactante, probablemente como medio de encontrar un lugar nuevo con fuentes nutricionales (Deziel *et al*, 2003). La regulación del desplazamiento, por las moléculas señal podría también reflejar las ventajas de detectar más bien la estructura física del ambiente que la presencia de otras bacterias (Redfiel, 2002).

El fenómeno de la salida en enjambre se ha estudiado extensivamente en *Serratia liquefaciens*. Este organismo se ha reportado que produce dos moléculas señal extracelulares llamadas, N-butanoyl L-homoserina lactona (BHL) y N-hexonyl L-homoserina lactona (HHL) que son responsable de detectar la densidad poblacional durante salida en enjambre (Lindum *et al*, 1998; Givskov *et al*, 1998). *S. liquefaciens* MG1 tienen dos genes *swrI* y *swrR*. El gene *swrI* codifica la AHL sintetasa (un generador de señal) que dirige la síntesis de BHL y de Hexanoyl-HL en un cociente molar de 10:1. El gen *swrR*, por otra parte, transcribe convergentemente un marco abierto de lectura que codifica para el polipéptido SwrR. La molécula BHL se enlaza a SwrR, que alternadamente regula la transcripción del gene *swrA*. A su vez, *swrA* codifica una péptido sintetasa que cataliza la producción del surfactante Serrawettin

W2. Este surfactante es un lipopéptido extracelular (lipodepsi-pentapéptido cíclico que lleva una cadena lateral del ácido graso de 3-hydroxy C10) que conduce a una reducción en la tensión superficial (Eberl, 1999)

Por lo tanto, las células de *S. liquefaciens*, que se encuentran creciendo en esta superficie crean una película de acondicionamiento que cambia la humedad y la tensión superficial del medio. La formación de esta película es dependiente de genes funcionales *swrI* y *swrA*. Estudios genéticos en *S. liquefaciens* demostraron que la mutación del gene *swrI* conduce a una inhibición de la capacidad de la salida en enjambre. Sin embargo, este defecto podía ser restaurado fácilmente suplementando al medio con BHL 150 nM o HHL 900 nM. Se ha encontrado que BHL puede ser más eficiente en promover la movilidad swarming que HHL. De igual forma, el defecto de la movilidad swarming de las dobles mutantes *swrI-swra* de *S. liquefaciens* pudo ser restaurado al suplementar al medio con Serrawettin W2 (Eberl, 1999).

Por lo tanto, las rutas conformacionales y biosintéticas son colectivamente responsables del comportamiento en la movilidad swarming. El operon principal flagelar FlhD-FlhC se ha visto que es el responsable de la diferenciación de la célula, es decir el desarrollo de células swarmer hiperflageladas, filamentosas y multinucleadas, a partir de células vegetativas. Cuando las células swarmer alcanzan una alta densidad celular (quorum), estimulan la expresión de los genes *swrI-swra* y el promotor del *swrA* que codifica el biosurfactante serrawettin W2. Esto reduce la tensión superficial y ayuda en la migración de las células swarmer sobre la superficie (Eberl, 1999).

#### **1.3.4. Diferencias bioquímicas entre células swarmer y células vegetativas**

Las células swarmer suelen ser fisiológica y bioquímicamente distinta de las células vegetativas. Durante la diferenciación de células vegetativas en células swarmer

se incrementa la producción de algunas proteínas tales como las flagelinas, ureasa, hemolisina y proteasa, que pueden estar relacionadas con la supervivencia de los organismos al desarrollar mecanismos de virulencia contra determinados hospederos. Muchas actividades enzimáticas tales como triptonasa,  $\beta$  galactosidasa y fosfatasa alcalina se reducen durante la diferenciación de la célula swarmer y sus niveles alcanzan otra vez el nivel normal después del proceso de consolidación de células swarmer. Similarmente, el cantidad de oxígeno, ácido nucleicos y la síntesis de proteínas también se reducen en las células swarmer en comparación a las células vegetativas. En el caso de las bacterias pigmentadas como *Serratia* y *Chromobacterium*, las células vegetativas contienen un pigmento anaranjado brillante, mientras que sus células swarmer se encontraron sin presencia alguna de color. Sin embargo, se invierten los estados pigmentados después de la consolidación. Este proceso fue reportado debido a la actividad de una metalo-proteasa de 50 kDa que desempeña un papel importante en la reiniciación del septum (Allison y Hughes, 1991; Alberti y Harshey, 1990).

### **1.3.5. Inhibición de la movilidad swarming**

#### **1.3.5.1 Técnicas que restringen físicamente la movilidad swarming.**

##### **1.3.5.1.1. Recubrimientos de agar.**

El uso de los recubrimientos del agar se ha recomendado para inhibir el swarming. Sin embargo, éste fue encontrado para no ser aplicado en el aislamiento de anaerobios facultativos; por otra parte, típicas morfologías coloniales de algunos organismos puede ser alterada. También, esta técnica no previene siempre el swarming en *Proteus* alrededor del borde y en la superficie superior del recubrimiento (Williams y Schwarzoff, 1978).

#### **1.3.5.1.2. Humedad superficial reducida**

Así como el swarming es dependiente sobre la humedad superficial, uso de las placas de agar secadas o placas de agar tratadas con alcohol antes de la inoculación han sido recomendadas para prevenir este fenómeno. Como siempre, este método no es muy confiable porque a la sequedad requerida para inhibir el swarming, suprimiría totalmente también el crecimiento de organismos (Smith, 1972).

#### **1.3.5.1.3. Inhibidores del crecimiento**

Varios antibióticos tales como neomicina, sulfamidas, combinaciones de polimixina y de inhibidores tales como hidratos de cloral y azida de sodio se han encontrado también que puede suprimir el swarming. La eficacia relativa de varios inhibidores metabólicos ha sido determinados en términos de la concentración de inhibición de crecimiento (GIC) / cociente de concentración de inhibición de células swarmer(SIC). El cociente GIC/SIC fue reportado para estreptomycin de 15.0 y 27.0 para proflavina (Henrichsen, 1972; Williams y Schwarzooff, 1978).

#### **1.3.5.1.4. Inhibición de la función flagelar.**

Varios compuestos fueron reportados para inhibir la salida en enjambre rompiendo la integridad estructural en la actividad del flagelo. Por ejemplo, añadiendo la sal ferrosa al medio con peptona/proteasa inhiben el swarming en *Proteus* sin afectar su crecimiento. Semejantemente, el ácido bórico inhibió el swarming en medio agar sangre sin afectar el crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae* (Solosky y Stapert, 1963).

### 1.3.5.2. Moléculas inhibidoras de la movilidad swarming

Diversas moléculas señal producidas por las bacterias (como AHLs y diketopiperazinas) o excretadas por las plantas (como furanonas) pueden influenciar el comportamiento swarming regulado por QS en otras bacterias diferentes de la bacteria productora (Daniels *et al* 2004). Por otra parte, varios géneros bacterianos pertenecientes a  $\alpha$ -Proteobacteria (Zhang *et al*, 2002),  $\beta$ -Proteobacteria (Lin *et al*, 2003),  $\gamma$ -Proteobacteria (Uroz *et al*, 2003)., bacterias Gram-positivas con bajos C+G (Dong *et al*, 2002) y bacterias Gram-positivas con alto G +C (Uroz *et al*, 2003)., han sido demostradas que reducen la concentración disponible presente de moléculas señal por degradación enzimática de AHLs producido por otras. Recientemente, la eficacia de usar una especie silvestre de *Bacillus* cepa A24, aislada de suelo, con capacidad de degradación de AHL a sido utilizada para el biocontrol de enfermedades de planta (Molina *et al*, 2003). La cepa A24 de *Bacillus* puede degradar AHLs producidas por patógenos de plantas, como *Erwinia carotovora*, y *A. tumefaciens*, exhibiendo actividad de amplio-espectro reduciendo visiblemente enfermedades de las plantas de papa y tomate causados por estas bacterias fitopatogénicas. Además, la cepa silvestre de *Rhodococcus erythropolis* degrada AHLs reduciendo marcadamente la patogenicidad de *E. carotovora* en tubérculos de papa (Uroz, *et al*, 2003).

#### 1.3.5.2.1. Diketopiperazinas

Los diketopiperazinas (DKPs), extraídos originalmente de sobrenadantes de células de *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter agglomerans*, tienen altos efectos biológicos y farmacológicos en células de organismos superiores (Prasad, 1995), sugiriendo su papel en la comunicación con células de plantas y animales más que con otras bacterias. DKPs activa algunos AHL-biosensores. Para obtener esta inducción, a menudo se requiere una concentración mucho más alta

de estas no-AHLs, en comparación con AHLs naturales (Holden *et al*, 1999). El factor Cyclo (L-Pro-L-Met) producido por *E. coli* estimula el desplazamiento swarming del mutante *swrI* de *S. liquefaciens* tan eficazmente como C4-HSL (Eberl *et al*, 1999). En contraste con esto, DPKs como Cyclo (L-Pro-L-Tyr) antagoniza la regulación de QS de *S. liquefaciens* en una concentración perceptiblemente más baja de los que son requeridos para inducir a un *E. coli* biosensor de AHL (Holden *et al*, 1999).

#### **1.3.5.2.2. Furanonas**

Se ha demostrado que la agregación de varias furanonas halogenadas exógenas, con semejanza estructural a una AHLs de cadena corta, aisladas de la alga marina *Delisea pulchra*, regulan negativamente la salida en enjambre en *S. liquefaciens* (Givskov, 1996). La transcripción del gen *swrA* de *S. liquefaciens* regulado por quorum sensing disminuye en presencia de furanonas halogenadas. Esto alternadamente da lugar a una producción reducida del compuesto tensoactivo Serrawettina W2, que es crucial para el desplazamiento superficial de las células swarmer (Givskov, 1996; Rasmussen *et al*, 2000). Los furanonas del *D. pulchra* no influyen la síntesis flagelar, la tasa de crecimiento, ni la elongación celular de *S. liquefaciens* (Givskov, 1996). El efecto inhibitorio ejercido por estos metabolitos no se limita a *S. liquefaciens*, la cual no se encuentra directamente naturalmente asociada a *D. pulchra*, además se ha visto el efecto de esta alga en el swarming de varias cepas bacterianas marinas, las cuales las furanonas inhiben este proceso (Givskov, 1996). Se ha encontrado que las furanonas participan en el bloqueo de la señal de QS en la bacteria *V. fischeri*, al no permitir la asociación entre la proteína LuxR y las AHLs (Manefield *et al*, 1999). Un estudio reciente sugirió que la reducción en la estabilidad de LuxR de *V. fischeri* es el mecanismo por el cual las furanonas controlan la expresión de los fenotipos dependientes de AHL (Manefield *et al*, 1999). Esta observación rechaza el modelo

anterior de que las furanonas compiten con AHLs por un sitio común con los homologos de LuxR (Manefield *et al*, 1999). Se ha encontrado que la cantidad de proteína está reducida hasta cien veces en presencia de las furanonas (Manefield *et al*, 1999). Una vez que la degradación de LuxR se inicio, no es reversible por la adición de AHLs. Sin embargo, la adición anterior de AHL ofrece una cierta protección (Manefield *et al*, 2002). Otros estudios han mostrado que una furanona sintética modificada, inhibe algunos procesos fisiológicos en *P. aeruginosa*, reprimiendo genes como *lasB* y *lasA*, que sintetizan elastasas y el gen *rhlAB* implicado en la producción de ramnolipidos (Hentzer *et al*, 2003; Hentzer *et al*, 2002).

#### **1.3.5.2.3 AHL mímicas producidas por plantas**

Recientemente, varias variedades de guisante y un número de otras plantas superiores han sido reportadas que producen moléculas que confunden a especies bacterianas. La concentración de compuestos de característica AHL-mimicas, en la superficie de la planta, pueden afectar la expresión de genes regulados por AHL en bacterias en ambientes naturales (Tepliski *et al*, 2000). Por ejemplo, estimulando el swarming, la planta puede evitar que las bacterias se concentren en suficientes números contra el hospedero (Bauer y Teplisky, 2001). Aunque la naturaleza química de los compuestos mímicos activos es actualmente desconocido, parece que las sustancias con señales de actividad AHL-mímica son químicamente diferentes de las AHLs bacterianas (Tepliski *et al*, 2000). Además de las observaciones con exudados de guisantes, varias especies de plantas superiores, incluyendo el arroz, la soja, tomate, chícharo y *Medicago truncatula*, secretan AHL-mímicas que inducen el swarming en *S. liquefaciens* (Tepliski *et al*, 2000). Resultados preliminares indican que las fracciones purificadas de *M. truncatula* podrían estimular LasR. Aunque las mismas fracciones afectan

perceptiblemente la iniciación del biofilm y la implicación del swarming, su efecto real sobre el swarming todavía se desconoce (Bauer y Robinson, 2002).

#### **1.3.5.2.4. Actividad Enzimática**

La actividad de la acil homoserina lactonasa, que hidroliza el anillo lactona de las AHLs, se demostró por primera vez en un bacilo aislado del suelo (Dong *et al*, 2000; Reimmann *et al*, 2002). Se hizo una búsqueda en una colección de bacterias aisladas de la rizósfera que interferían con el sistema QS en *P. aeruginosa* identificándose dos especies de *Bacillus* con actividad de degradación de AHL. Esta actividad es codificada en ambas cepas por un solo gene *aiiA* (Reimmann *et al*, 2002).

Al parecer, la degradación intracelular de las moléculas señal difusibles de C4-HSL y C6-HSL producido por *P. aeruginosa*, reduce la concentración local de la señal (Reimmann *et al*, 2002). Las cepas de *B. thuringiensis* y de las especies estrechamente emparentadas como *B. cereus* y *B. mycoides* producen también enzimas que inactivan las AHL (Dong *et al*, 2002; Lee *et al*, 2002). La expresión de los genes *aiiA* de *Bacillus* en *P. aeruginosa*, previene totalmente la acumulación de C4-HSL. Hay una disminución en la producción de ramnolipidos y consecuentemente, una reducción fuertemente en el desplazamiento swarming (Reimmann *et al*, 2002). Además de la AHL lactonasa, una aminoacilasa capaz de inactivar AHLs se ha descrito en *V. paradoxus* (Leadbetter y Greenberg, 2000) y recientemente también en *Ralstonia* (Lin *et al*, 2003). La enzima AiiD, hidroliza la amida de la AHL, resultando para esto HSL y el ácido graso correspondiente. La expresión heteróloga del gen *aiiD* en *P. aeruginosa* apaga el Quórum Sensing, reduciendo perceptiblemente su capacidad de swarming (Lin *et al*, 2003).

#### **1.4. Ecosistemas de manglar**

Los manglares, son ecosistemas altamente productivos y proveen cantidades de materia orgánica en forma de detritus a las aguas adyacentes (Tomlinson, 1986). Estos ecosistemas tienen una cadena alimenticia muy extensa basada en el detritus de la cual se benefician desde crustáceos, moluscos, poliquetos, y otros invertebrados, hasta peces (Odum y Herald, 1975). Los manglares son generalmente deficientes en nutrientes, especialmente en nitrógeno y fósforo (Holguin *et al.*, 1992), y sin embargo son altamente productivos. Esto se puede explicar debido a que la comunidad microbiana que habita en el manglar altamente productiva y diversa, recicla los nutrientes proveyendo de nitrógeno y fósforo a la vegetación, la cual a su vez, mediante el proceso de exudación aporta el carbono y la energía necesaria para el crecimiento microbiano (Bashan, y Holguin, 2002 ; Toledo *et al.* 1995; Vazquez *et al.* 2000). Existe suficiente evidencia para proponer que existe dentro del manglar una estrecha asociación microbio-nutriente-mangle que optimiza el uso de los nutrientes (Alongi *et al.* 1993 ; Holguin *et al.* 1999, 2001).

## II. ANTECEDENTES

El desplazamiento swarming ha sido demostrado en un gran número de bacterias incluyendo miembros de *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodospirillum*, *Salmonella*, *Serratia*, *Sinorhizobium*, *Vibrio* y *Yersinia* (Allison y Hughes, 1991; Harshey, 1994; Daniels *et al*, 2004).

En algunos grupos bacterianos, como en el caso de *Azospirillum* y *Rhodospirillum*, no se sabe cual es el mecanismo por el cual la bacteria adquiere este comportamiento o si esta presente algún factor que detone la avanzada sobre superficies (Harsey, 1994). Mientras que en otras bacterias como *Escherichia*, *Salmonella* y *Clostridium*, se relaciona la movilidad swarming, con genes relacionados con quimotaxis y el desarrollo de sistemas flagelares laterales (Harsey y Matsuyama, 1994).

Se sabe que en algunos grupos bacterianos que presentan desplazamiento swarming, el sistema quórum sensing, es ocasionado por varias moléculas que funcionan como autoinductoras. Daniels y colaboradores (2002), mencionan que los autoinductores mas estudiados y presentes en la mayoría de las bacterias son peptidos pequeños (oligopeptidos), AI2 (Borato diester) y las AHLs.

Cosby y colaboradores (1998) reportan la relación entre oligopetidos pequeños y el desplazamiento swarming en *Bacillus subtilis*. Estos autoinductores se comportan similares a las AHLs, interviniendo una densidad poblacional en un sistema quórum sensing.

Como ya se comento anteriormente, el QS, principalmente en bacterias gram negativas que sintetizan AHL, está relacionada, de una manera directa con la movilidad swarming, por ejemplo, regulando genes relacionados con la formación de limo extracelular que participa como un biosurfactante en superficies, dependientes de la densidad poblacional, como son los ramnolípidos en *Pseudomonas* y Serrawetina en *Serratia*, etc (Daniels *et al*, 2002). Whitehaed y colaboradores (2001), menciona que la regulación de la movilidad swarming por QS permite la óptima diseminación en bacterias patógenas de plantas y animales, incluso en humanos.

Entre las especies patógenas donde han sido mas estudiadas se encuentran especies de *Serratia*, *Pseudomonas* y *Proteus*, donde esta última se ha asociado la movilidad con un péptido capsular. Eberl, (1999) comenta que la razón por la que han sido mas estudiadas obedece a la relación de estas bacterias con la microbiología clínica y la búsqueda de nuevos tratamientos contra enfermedades.

Givskov y colaboradores (1998), reportó que la bacteria *S. liquefaciens*, patógena en humanos, produce AHLs, las cuales fueron asociadas al desplazamiento swarming al regular la síntesis del gen *swrA* que codifica el biosurfactante Serrawetina. Este biosurfactante es regulado por los genes *swrI* y *swrR*, homólogos de *luxRI*, del sistema QS. La mutación de ambos genes, no permite que la bacteria presente la movilidad swarming, al no romperse la tensión superficial.

Alberti y Harshey, (1990) reportan movilidad swarming en *S. marcescens*, encontrando que los genes *smaIR*, homólogos de *luxIR*, participan en la regulación de los genes *smaA*, que codifican para un biosurfactante que facilita la movilidad sobre la

superficie, similar que *S. liquefaciens*. La naturaleza del biosurfactante se desconoce, pero se piensa que puede ser similar a Serrawetina.

Williams y colaboradores, (2000), reportan en *Pseudomonas aureginosa*, que el QS controla la expresión de un número de factores extracelulares de virulencia y metabolitos secundarios como los ramnolípidos. Los genes *rhIR*, son los encargados de la síntesis de ramnolípidos, utilizados como biosurfactantes en el desplazamiento swarming. Los más conocidos son el L-rhamnosyl-beta-hydroxidecanoil-beta-hydroxidecanoato y el L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-beta-hidroxicail-beta-hydroxidecanoato (Reimmann *et al*, 2001).

Kinscherf y Willis, (1999), reportan desplazamiento swarming en *P. syringae*, patógeno en plantas. El regulador global *gacA*, gen que esta involucrado con la producción de productos extracelulares como la hidroxicianida, es regulado por la presencia de los genes *ahlIR* del QS. Una mutación de los genes *ahlIR*, trae por consiguiente que la bacteria no presente un desplazamiento swarming y además no permite que el gene *gacA* se codifique.

Huber y colaboradores (2001), reportan que los genes *cepRI*, en *Burkholderia cepacia* bacteria patógena en pacientes con fibrosis quística, están relacionados con la movilidad swarming a través de la síntesis de un biosurfactante. Además mencionan la relación que puede llegar a tener este biosurfactante con la producción de biopelículas, importantes en etapas de infección y colonización de tejidos animales. La naturaleza del biosurfactante no se ha dilucidado aun (Huber *et al*, 2001).

Whitehead y colaboradores (1999), reportan que los genes *esaIR*, homólogos de *luxIR* están relacionados con la adhesión, swarming y producción de biopelículas en *Pantoea stewartii*.

Young y colaboradores (1999), reporta que en *Yersinia enterocolitica*, una mutación en los genes *yenIR*, homólogos de *luxIR*, afectan la movilidad swarming, no permitiendo que la bacteria produzca un tipo de limo extracelular.

Aunque los estudios en las últimas décadas han relacionado el fenómeno swarming con las AHL, se han reportado que bacterias como *Proteus mirabilis* y *Vibrio parahaemolyticus* presentan otro tipo de QS, regulado por AIs diferentes conocidos como AI2, muy estudiados en la luminosidad de *V. harvey*, y actualmente estudiado en varias especies bacterianas (Bassler, 1999).

Fraser y Hughes (1999), mencionan que aparte de la relación que presenta un polisacárido capsular en el desplazamiento swarming en *Proteus mirabilis*, la actividad de la molécula borato diéster (AI2) influye en la migración de la bacteria *in vitro*.

Enos-Berlage y Mc Carter (2000), reportan que *V. parahaemolyticus*, bacteria patógena produce dos diferentes moléculas señal, una AHL y AI-2, y que esta última está relacionada con el desplazamiento swarming al regular los genes *opaR*, homólogo del gen *luxR* de *Vibrio harveyi* que codifica para un polisacárido capsular, que permite la fluidez sobre superficies. Hasta este momento no se ha demostrado efecto del autoinductor AHL sobre el swarming en *V. parahaemolyticus*, sin embargo,

se piensa que pudiera estar relacionado con los patrones de colonización de una colonia bacteriana, mas que en la presencia de un limo extracelular (Daniels *et al*, 2002).

Como se ha presentado anteriormente, los estudios más extensos acerca de la movilidad swarming han sido más enfocados en bacterias patogénicas que en aquellos bacterias que presenten una relación benéfica con organismos superiores. Hasta el momento, no existen trabajos donde relacionen la movilidad swarming en bacterias, con alguna especie animal, donde esta relación sea de manera benéfica, dándole al hospedero la posibilidad de salir beneficiado con esta relación.

Daniels y colaboradores (2002), reporta que *Rhizobium etli*, bacteria benéfica en leguminosas, produce por lo menos siete diversas moléculas señal quórum sensing, que regulan los genes *cinIR*. Estos genes se ha reportado que intervienen en la producción de una biopelícula de acondicionamiento superficial, que facilita el desplazamiento de la colonia, presentando un patrón típico de swarming. *R. etli* es el primer miembro de Rhizobiaceae con un comportamiento swarming regulado por quórum sensing (Daniels *et al*, 2002), además de ser el único reporte que existe acerca de la presencia de movilidad swarming en una bacterias benéfica asociada a plantas.

Soto y colaboradores (2002), reportan una movilidad swarming para el mutante del gen *fadD* de *Sinorhizobium meliloti*. Aunque los derivados de ácido grasos fueron sugeridos como señales intracelulares que controlaban la movilidad, los autores no encontraron ninguna evidencia del papel de las AHLs en la regulación del comportamiento swarming de esta bacteria. Es muy poco conocido que factores

involucran la movilidad swarming entre rizobacterias. Casos como en *S. meliloti* y *R. etli* son los únicos reportados.

En base a lo antes mencionado, muchas bacterias gram-negativas tienen relaciones simbióticas o patogénicas tanto con organismos procariotes y eucariotes. No es de asombrarse que en estas relaciones simbióticas y patogénicas, los sistemas QS y en especial la participación del AI AHL, sea de suma importancia en la regulación de estos complejos sistemas (Mathesius, 2003).

El papel del sistema de señales por AHLs en interacciones entre bacterias y sus ambientes bióticos y abióticos es estudiado en estos momentos para explicar como es posible la regulación de genes entre especies de diferentes organismos (Pierson *et al*, 1999)

El común uso de las AHL por diversas tipos de bacterias gram-negativas sugiere que juegan importantes papeles en los ciclos de vida de estas bacterias. Una atractiva hipótesis es que las señales pueden permitir a la bacteria sentir su propio tamaño de la población y retrasar la expresión de genes específicos aun que la densidad celular crítica ha sido lograda (Dunlap, 1997; Swift *et al*, 1996).

El intercambio de la señal entre diferentes rizobacterias en la rizosfera se basa en la producción de moléculas señal de sistemas QS como las AHLs permitiendo que la población entera inicie una acción concertada una vez que una concentración crítica se haya alcanzado (Handelsman y Stabb, 1996; Loh *et al*, 2002).

Pierson y colaboradores (1998), comentan que muchas bacterias asociadas a plantas producen y utilizan las moléculas señal difusibles AHLs para regular la expresión de genes específicos y operones bacterianos.

Algunos de los genes que se ha visto que regulan las AHLs en bacterias asociadas a plantas son la producción de rizopinas, enzimas extracelulares como las proteasas, celulasas, pectinasas, proteínas Hrp y antibióticos (Pierson *et al*, 1998). Las bacterias asociadas a plantas que utilizan la molécula AHL incluyen bacterias gram negativas patógenas, no patógenas y simbioses asociadas a plantas, incluyendo a *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. stewartii*, *Pantoea stewartii subs. stewartii*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*, *R. etli*, *R. freedii*, *Serratia liquefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas aureofaciens* (Pierson *et al*, 1998; Sharma *et al*, 2003; Daniels *et al*, 2004). Con la excepción de *P. aureofaciens*, pocas bacterias benéficas en plantas, que regulan genes a través de la molécula señal AHL, han sido muy estudiadas (Mazzola *et al*, 1992).

Al parecer, la producción de AHLs es un fenómeno común en bacterias asociadas a plantas. Cha *et al* (1998) ha sugerido que aproximadamente el 50% de las bacterias que se asocian a plantas probablemente produzcan AHLs.

Elasri *et al* (2001) menciona que en varias especies de *Pseudomonas* aisladas de plantas fue mas frecuente la producción de AHLs que en especies aisladas del suelo, lo

cual sugiere que el QS y tal vez la comunicación celular es muy importante en bacterias asociadas a plantas.

La mayoría de las bacterias asociadas a plantas, que producen AHL, son asociadas a plantas de interés comercial en la agricultura, que inciden en ellas de una manera patógena o en una forma benéfica ya sea directa o indirectamente. Existen pocos reportes acerca de bacterias asociadas a plantas aisladas de habitats marinos, como son los manglares (Holguin, *et al*, sin publicar).

Uno de los primeros estudios en ecosistemas de manglar es reportado por Holguin *et al* (datos no publicados) quien aisló rizobacterias asociadas a raíces de *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* encontrando que la mayoría de las especies de bacterias tenían la capacidad de sintetizar AHLs. Algunas de estas rizobacterias se encontraron que tenían propiedades para poder promover el crecimiento mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfato del sedimento, además de producción fitohormonas, como el ácido indolacético. Además de estos resultados, también se reporta la presencia de cantidades significativas de AHLs en sedimento asociado a raíces de las especies de árboles de mangle.

En un estudio anterior, Holguin (2002), menciona que las bacterias en ecosistemas de manglar, pueden llegar a ser de gran importancia para el crecimiento y la estabilidad de los ecosistemas de manglar, permitiendo la captación de nutrientes y el óptimo crecimiento de las plantas.

En ecosistemas de manglar se han aislado bacterias diazotroficas de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Klebsiella*, de sedimentos, rizosfera y superficies de las raíces de varias especies de mangle en la india. (Segueta y Chaudhuri, 1991). Algunas bacterias diazotroficas se han aislado de la rizosfera de las especies de mangle negro, blanco y rojo, en México (Holguin et al, 1992). Se reportan las bacterias *Vibrio campelli*, *Listonella anguillarum*, *V. aestuarinus* y *Phyllobacterium* sp. (Holguin y Bashan, 1996; Rojas et al, 2001; Holguin et al, no publicado).

Recientemente Flores-Mireles (2005), aisló una cepa de *Vibrio* 9B, la cual aparte de demostrar la presencia de los gen *nifH* y *nirK* que codifican para una dinitrogenasa y una nitrito reductasa con Cu, importantes en el proceso de desnitrificación, encontró que esta cepa presentaba una producción de AHL.

Además del reporte anterior, se reportan los aislamientos en raíces del mangle negro, de algunas cepas de *Vibrio*, como *Vibrio proteolyticus*, con capacidad de solubilizar fosfato (Vazquez et al, 2000); *Vibrio campbellii*, *Listonella anguillarum* (*syn* *Vibrio anguillarum*) y *Vibrio aestuarinus*, las cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno (Holguin et al, 1992). Sin embargo, estas cepas no se les hicieron un análisis mas afondo acerca de la relación de esas características promotoras del crecimiento en plantas, con la posible producción de algún autoinductor.

El único reporte donde utilizan a cepas de *Vibrio* para promover el crecimiento vegetal es el presentado por Bashan y colaboradores (2000), donde reporta la asociación entre *Vibrio aestuarinus* (una bacteria fijadora de nitrogeno) y *V. proteolyticus* (bacteria solubilizadora de fosfato), ambas aisladas de mangle negro,

como inoculantes en *Salicornia bigelovi* (pasto asociado a ecosistemas de manglar), incrementando la altura y el peso seco de las plantas, promoviendo el crecimiento al incrementar el nitrógeno, proteínas, etc. A pesar de este reporte alentador, no se busco involucrar la promoción de crecimiento por esta cepa, con plántulas de mangle.

Como se ha mencionado, aunque existen reportes acerca de la relación entre la regulación de movilidad swarming por parte de las AHLs en bacterias patógenas, los reportes en bacterias benéficas o con características promotoras del crecimiento en plantas, son escasos. En estos reportes, hasta la fecha, se busca relacionar el efecto in vivo de esta movilidad en una determinada colonización en plantas.

Además, son nulos los reportes donde relacionan el desplazamiento swarming, producido por cepas de *Vibrio*, con la producción de AHL. No existen reportes acerca de la relación que presente la regulación del desplazamiento swarming por la síntesis de AHLs, en una cepa de aislada de la rizosfera del mangle.

### **III. JUSTIFICACION**

El estudio de la movilidad swarming regulado por la molécula AHL en una bacteria aislada de la rizosfera, aun no ha sido reportado, por lo tanto es importante una contribución al estudio de este tipo de desplazamiento típico en patógenos, del cual poco se sabe su relación con aspectos benéficos.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- Determinar si las moléculas señal, tipo acilo homoserina lactonas (AHL), producidas por la cepa de *Vibrio LR6HC*, están involucradas en la movilidad swarming.

### 4.2. Objetivos particulares

- Identificar y aislar AHL producidas por *Vibrio LR6HC*
- Caracterizar el desplazamiento swarming en *Vibrio LR6HC*
- Alterar la síntesis de AHL producidas por *Vibrio LR6HC* generando una cepa modificada (afectada) en la síntesis de AHL.
- Detectar presencia o ausencia de AHL utilizando TLC y HPLC con ESMS.
- Comparar el desplazamiento swarming entre cepa silvestre y cepa modificada de *Vibrio LR6HC*

## V. HIPÓTESIS

Debido a que se ha reportado en bacterias aisladas de la rizosfera la producción de molécula señal AHL; y además que esta molécula tiene la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos en bacterias, suponemos que las AHLs producidas por la cepa de *Vibrio LR6HC*, aislada de la rizosfera del mangle negro, están involucradas en el desplazamiento swarming.

## VI. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. DETECCION DE AHL

#### 6.1.1. Pruebas presuntivas de producción de AHL

Se realizó una prueba presuntiva de producción de AHL a la cepa *Vibrio* LR6HC aisladas de las raíces del mangle utilizando 2 diferentes biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026, y *Agrobacterium tumefaciens* KYC55.

Se sembró la cepa de *Vibrio* en placas con medio marino 2216 dejando incubar 24 horas a 30°C. Después del tiempo se inoculo en 10 ml de medio LB al 2% de NaCl incubando 8 a 9 horas a 130rpm y 30°C. Además, *Chromobacterium violaceum* CV026 se activó directamente en LB líquido suplementado con 100 ug/ml de kanamicina a partir del congelado. En placas de medio marino 2216 modificado, se colocaron tanto la cepa biosensora como la cepa de *Vibrio* en posición de “T”, evitando un contacto entre ellas. Ambas cepas se dejaron incubar de 12 a 24 h a 30°C, esperando obtener respuesta después de las 12 h.

Utilizando la cepa biosensora, *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 (pJZ372) (pJZ384) (pJZ410) (Zhu et al., 2003). La cepa biosensora se inoculó directamente a partir de células preinducidas, dejando incubar durante 48 h. Se realizó la prueba presuntiva en placas de medio mínimo HGB (Holguin, et al., 1992), suplementado con 60 µg/ml de X-gal (5-Bromo-4-Cholor-3-Indolyl-β-D.galactopyranosida), la cual fue disuelta en Dimetilsulfoxido. La colocación de ambas cepas fue similar a la prueba con el anterior biosensor, con las mismas condiciones.

#### 6.1.2. Extracción de AHLs

Se activó la cepa de *Vibrio* en placa de medio 2216 a las condiciones anteriormente descritas. Se realizó un preinóculo en 25 ml de medio marino 2216 a

28°C y 130 rpm de 8 a 12 h. Se tomó 1 ml del preinóculo y se realizó un inóculo en 500 ml de medio HGB sin glucosa, suplementado con 0.15% de glicerol, incubándose a 28°C, 130 rpm durante 12, 24, 48 y 72 horas. Estos cultivos fueron centrifugados a 8000g por 15 minutos. Para separar las fases, donde fue desechado el pellet celular. Se almacenó el sobrenadante a 4°C.

Se adicionó un volumen de acetato de etilo acidificado (0.1 ml de ácido acético glacial/L) y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Se dejó en reposo hasta la separación de fases, donde se colectó la fase superior que contenía el solvente. Se realizaron 2 extracciones al sobrenadante, con el mismo volumen de solvente. Las 3 fracciones fueron combinadas y se agregaron 2 cucharadas de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua de la fase conteniendo las AHLs. La fase se decantó y se almacenó a 4°C. El extracto fue evaporado en un evaporador rotatorio Yamato RE200 (Yamato Scientific America, Inc. Orangeburg, NY) manteniéndose en baño María a 45°C. El extracto se evaporó hasta un volumen aproximadamente de menos de 100 µl, donde se colectaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Los extractos se almacenaron a -20°C.

### **6.1.3. Identificación de AHLs por cromatografía en capa fina (TLC)**

Los extractos de AHL (5µl) y los estándares sintéticos de AHL (4C-HSL, 6C-HSL, 3O,6C-HSL, 8C-HSL) se aplicaron en placas de cromatografía de fase reversa (200-µm layer thickness, Whatman). Las placas se corrieron con metanol-agua 60:40 por volumen, y posteriormente se dejó secar toda 12 a 16 h.

Después de este tiempo, la placa fue revelada con una capa de agar junto a las bacterias biosensoras *C. violaceum* CV026 o *A. tumefaciens* KYC55. En el revelado de *C. violaceum* CV026, se depositó 25ml del cultivo bacteriano en agar LB semisólido (1%), mezclando perfectamente, para después depositarlo en la placa de TLC seca. Para

el revelado de *A. tumefaciens* KYC55, se agregaron 100µl de células preinducidas en 100 ml de medio AT agar semisólido (1%) suplementado con X-gal(5-Bromo-4-Cholor-3-Indolyl-β-D.galactopyranosida), mezclando bien ambos y al igual que el otro biosensor, depositándolo en la placa de TLC seca. Las placas con los cultivos se dejaron incubar de 12 a 24h a 28°C.

#### **6.1.4. Identificación de AHL por espectrometría de masas**

Para su posterior caracterización, los extractos almacenados de *Vibrio* fueron evaporados y resuspendidos en 10 µl de acetonitrilo, utilizando solo 0.2 µl para el análisis en GC/MS. El análisis de GC/MS se realizó en un Hewlett-Packard modelo 5890 ajustado con un detector selectivo de masa modelo 5971A y una columna gruesa de 6 m x 0.2 mm de 0.33 µm de 5% PH ME siloxano (Hewlett-Packard). Todas las fracciones fueron analizadas por fragmentación y monitoreo de ion libre para las masas 143, 172 y 185. Comúnmente, los fragmentos con masa 143 fueron los predominantes en AHLs sin sustituciones, mientras que las 3-hidroxi-AHLs presentan picos predominantes a una masa 173, y las moléculas 3-oxo-AHLs a 185. Posteriormente las mismas fracciones fueron tratadas con 150 µl de MeCN y 50 µl de ácido fórmico al 1 % en agua y sometido al espectrómetro de masas de ionización por electroespray en tándem (ESI MS/MS) como es descrito por Marketon *et al.* (2002). Los tiempos de retención para HPLC y GC/MS, así como los patrones de fragmentación de GC/MS y ESI MS/MS, fueron comparados con aquellos para AHLs sintéticas, las cuales fueron químicamente sintetizadas como describió Eberhard y Schineller (2000).

## **6.2. DETECCION DE MOVILIDAD SWARMING**

### **6.2.1. Detección de desplazamiento swarming en placa petri**

Se inoculo la cepa de *Vibrio* en 25 ml de medio LB 2% NaCl a 28°C, 130rpm 8 o 9h hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> 0.8 o 0.9. Se puntearon 5 µl del inoculo en el centro de placas de medio LB 2% NaCl semisólido (0.7%) suplementado con ácidos casamino 0.6%. Las placas fueron secadas en una estufa a 40°C para eliminar por completo la presencia de humedad. Se incubo 30°C de 24 a 48 h.

Además, se realizó la misma metodología anteriormente descrita, utilizando diferentes medios de cultivo como medio marino 2216, medio HGB suplementado con diferentes fuentes de carbono (glucosa, glicerol, manosa y ácido málico), medio TCBS y medio AT. En todos los medios de cultivos se manejo la misma condición semisólida de agar (0.7%) y la misma cantidad de ácidos casamino (0.6%).

### **6.2.2. Microscopia electrónica de Barrido (SEM)**

Se realizaron preparaciones para observar el desplazamiento de la bacteria en condiciones óptimas de swarming. Para esto, se cortaron trozos de agar de aproximadamente 1cm de placas con una movilidad de la colonia de 15 cm. Los trozos fueron tomados de 3 diferentes lugares de crecimiento (centro, medio y periferia). Se colocaron los trozos de agar en microplacas donde se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en un buffer de PO<sub>4</sub> (4%) y paraformaldehido (50 µM pH 6.8) por un periodo de 12 a 16 horas a una temperatura de 4°C. Después se lavo 3 veces con buffer de PO<sub>4</sub> y se le agrego tetraóxido de osmio 2% 1 h. Se lavo con agua destilada hasta eliminar el exceso de osmio, y se procedió a deshidratar las muestras en concentraciones seriadas de alcohol al 30, 50, 70, 90 y 100% en tiempos de 5 minutos. Las muestras en alcohol al 100% se colocaron en una cámara de secado a punto crítico marca (DESK II) donde se

elimino por completo el alcohol y se reemplazo por CO<sub>2</sub> gaseoso. Por último las muestras se metalizaron con paladium de oro (Samdri-PUT-3B), para poder observarlas finamente en el microscopio electrónico de Barrido (Hitachi S3000-N).

### **6.2.3. Microscopia electrónica de Transmisión (TEM)**

Para las preparaciones en TEM, se realizó el mismo procedimiento de corte, fijación y deshidratación mencionado en las muestras para SEM. Cuando las muestras se encontraban en alcohol absoluto, se añadió una cantidad de resina acrílica blanca, en una proporción 1:1 y se dejó por 24 horas a una temperatura de 4°C. Pasando este tiempo, se descartó la mezcla y es substituida por resina acrílica al 100%, tratando que esta, cubra por completo el trozo de agar. Se dejo a las mismas condiciones de tiempo y temperatura anteriores. Este último paso se repite 3 veces para que la resina entre gradualmente a la célula y desplace por completo al alcohol. Una vez pasado este tiempo, se colocaron los trozos de agar en cápsulas de gelatina con resina acrílica en una estufa a una temperatura de 50 a 60°C hasta que solidifique la resina. Ya solidificada, se cortaron las muestras en un microtomo marca...para obtener cortes semifinos (0.9 µm), los cuales se tiñeron con azul de toluidina 1%, para su observación al microscopio óptico. Con la observación de los cortes al microscopio óptico, se obtiene una precisión de donde se encuentran las zonas a observar con mayor detalle en TEM. Identificadas las zonas, se prepararon cortes finales ultrafinos (0.5µm) los cuales se depositaron en celdillas de cobre (grids) de 400 mesh y se tiñeron con un tratamiento con acido cacodílico, para su observación en microscopio electrónico de transmisión.

#### **6.2.4. Efecto de las AHL sintéticas en el swarming de *Vibrio* LR6HC**

Se inoculo la cepa de *Vibrio* LR6HC en el medio y condiciones óptimas anteriormente descritas. Antes de puntear la bacteria en placas semisólidas anteriormente mencionadas, se colocaron 5µl de AHL de 4C-HSL, 6C-HSL, 3O,6C-HSL y 8C-HSL a diferentes concentraciones que iba desde 0.05mM a 5 mM. Se dejo que evaporara el solvente y se punteo la bacteria y se dejo incubar. Se introdujo un control, que fue solo el punteo del solvente (acetato de etilo) para descartar el efecto de este en la movilidad.

#### **6.3. Método de detección de biosurfactante-prueba de la gota de agua**

El método de la gota de agua (Water Doplelet Test), fue reportado por Hildebrand, (1989) para detectar la producción de moléculas que se comportan como surfactantes. Se incubó la cepa a temperatura y medio optimo anteriormente descrito. Después se tomaron 5 µl del inóculo bacteriano y se transfirió a una gota con 50µl de agua en una caja petri de plástico. Si el biosurfactante esta presente en el inóculo bacteriano, la tensión superficial de la gota puede reducirse, presentándose un colapso de la gota de agua.

#### **6.4. Extracción de Biosurfactante**

Se realizó una extracción de Biosurfactante, en base al método que reporta Laycock, (1991). La cepa de *Vibrio* se inoculó en 200 ml de medio de cultivo y temperatura óptimos, por un lapso de 30 h. Después se centrifugó a 20000g por 30 minutos para precipitar las células. Se obtuvo un sobrenadante el cual fue acidificado a pH 2 con 2N HCL y almacenado a 2°C por 1 h.

Después del tiempo, se centrifugó a 20000g por 15 min y se recuperó el pellet con 60 ml de etanol al 95%. Esta mezcla fue filtrada al vacío, recuperándose el solvente y extrayendo de nuevo con etanol al 95 %. El pellet fue descartado y las fracciones con etanol fueron combinadas y evaporadas en un evaporador rotatorio hasta obtener una fracción de 3 a 5 ml. Se añadió una cantidad pequeña de carbón activado para eliminar el color. La solución fue filtrada y guardada a 4°C.

#### **6.4.1. Formación de Biopelículas**

Se inoculó la cepa de *Vibrio* LR6HC en placas de LB 2% NaCl de 12 a 16 hr a 30°C. Después se tomaron colonias de células las cuales fueron resuspendidas en 5 ml de medio LB 2% NaCl y ajustadas a una  $DO_{600}$  de 0.3. Se tomo 3µl de la suspensión celular y se añadió a 300 ul de medio LB 2% NaCl en unos tubos de borosilacato de 35 ml. Los cultivos fueron incubados sin agitación a 30°C de 32 a 48h. Las células no adheridas fueron removidas con agua destilada cada 16 horas. Se añadió glutaraldehido 2.5% en buffer de cacodilato de sodio para fija las células. Las biopelículas fueron teñidas añadiendo 350ul de cristal violeta al 1%, seguido por un lavado con agua destilada. Las células adheridas al colorante fueron solubilizadas en 400ul de dimethyl sulfoxido (DMSO) y cuantificados a  $OD_{570}$ . Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### **6.5. Alteración en producción de AHLs**

##### **6.5.1. Conjugación**

Se realizó una conjugación entre las cepas *Vibrio* LR6HC y la bacteria *Escherichia coli* S17(pDSK519:*aiiA*), la cual presenta un gen que sintetiza para la enzima acil homoserina lactonasa. Para buscar una contraselección, en la búsqueda de

una colonia transconjugante, se generaron cepas resistentes de *Vibrio* al antibiótico rifampicina. Se inoculó esta bacteria en 25 ml de medio LB 2% NaCl a 28°C, 9 h. Después se lavó en buffer de fosfatos 0.3M 3 veces y se centrifugó a 6000g por 5 minutos a 4°C para recuperar el botón celular y resuspenderlo en 5 ml de buffer de MgSO<sub>4</sub> 1M. Se plaquearon 100 µl en placas de medio LB 2% NaCl suplementado con 100 µg/ml de rifampicina y se incubaron a 28°C por 24 horas.

Para la realización de la conjugación, se creció la cepa de *Vibrio* en 10 ml de LB 2% NaCl suplementado con rifampicina a 28°C 130rpm por un tiempo de 9 horas. Por su parte, se creció *Escherichia coli* S17 en 10 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina a 37°C, 130 rpm por un tiempo de 16 horas.

Después del tiempo de incubación, ambas cepas fueron lavadas dos veces en medio de cultivo óptimo para eliminar la presencia de antibióticos y se ajustaron a DO<sub>600</sub> de 1.0. Después se resuspendieron en 5ml de MgSO<sub>4</sub> 10mM, 200µl de la cepa receptora de *Vibrio* LR6HC y 200µl de la cepa donadora *Escherichia coli* S17. Se mezcló bien y se puntaron 100µl en una placa de medio LB 2% NaCl y se distribuyó por todo el contorno de la placa. Se dejó incubar a 30°C por 12 a 16 horas. Posteriormente se tomó con una asa bacteriológica todo el crecimiento que se obtuvo en la placa y se colocó en 5 ml de MgSO<sub>4</sub> 10mM y se procedió a vortexear vigorosamente. Se ajustó a una DO<sub>600</sub> de 0.5 y se realizaron una serie de diluciones y plaqueo con 100µl de la mezcla en placas de selección (LB 2% NaCl con 100µl de rifampicina y 50µl de kanamicina), incubándose a 30°C y 24 h.

Para determinar el número de células viables, se utilizaron placas con medio óptimo para *Vibrio*, pero sin antibiótico, como controles. Se calculó el porcentaje de conjugación en base a la siguiente fórmula: número de células conjugadas por ml/número de células totales por ml.

### 6.5.2. Extracción de DNA plasmídico

Se realizaron extracción de DNA plasmídico tanto para las cepas silvestres y modificadas de *Vibrio* LR6HC además de *E. coli* S17.

De cultivos de una noche, a condiciones optimas de crecimiento y con los respectivos antibióticos, se colocaron 3 ml en tubos eppendorfs de 1.5ml y fueron centrifugados a 14000g por 10 minuto a 4°C, para eliminar por completo la presencia de antibiótico y obtener un pelet considerable de células, el cual fue lavado con solución I fría (50mM glucosa, 25mM Tris-HCL pH8.0, 10mM EDTA pH8.0). Se centrifugó a 14000g por dos minutos a 4°C donde el sobrenadante fue removido y el pelet fue resuspendido en 100ul de solución I fría dejando incubar 10 minutos en hielo. Después se añadió 300ul de solución II (0.2 N NaOH, 1%SDS) recién preparada y se mezcló 5 veces por inversión, dejando incubar 5 minuto a temperatura ambiente y 5 minutos en hielo. La suspensión se neutralizó con 150 ul de solución III fría (3.0 M de acetato de potasio pH 4.8), mezclando por inversión varias veces e incubado en hielo por 30 minutos. Después de este tiempo, la mezcla fue centrifugada a 14000g por 20 min a 4°C y el sobrenadante recuperado (aproximadamente 350ul) fue trasferido a nuevos tubos eppendorfs. Se agrego 1 ml de etanol absoluto a almacenado a -20°C y se mezcló por inversión varias veces, dejando reposar de 12 a 16 h a -20°C. Se centrifugo a 14000g por 20 min a 4°C y se descarto cuidadosamente el sobrenadante.. El pelet obtenido se lavó dos veces con 1ml de etanol al 70% almacenado a -20°C, centrifugándolo a 14000g por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron secaron los tubos a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporara por completo. Se resuspendió después en 50 ul de bufer TE pH 8.0 y se adicionó 2ug/ul de RNAsa A y se incubo a 37 C por 30 min. Para comprobar el estado del DNA plasmídico, se corrieron 5ul en un gel de agarosa al 0.7% a 110 V durante 50 minutos.

### 6.5.3. PCR del gen *aiiA*

Se amplificó el gen *aiiA* presente en el plasmido PDSK519, usando el par de oligonucleotidos forward 5'-ATC GGA TCC ATG ACA GTA AAG AAG CTT TAT TTC G-3', y reverse 5'-GTC GAA TTC CTC AAC AAG ATA CTC CTA ATG ATG T-3' de *Bacillus anthracis* (Dong *et al.*, 2000). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una temperatura inicial de 94°C por 3', 35 ciclos de 1' a 92°C, 1' a 55°C, 1' a 72°C y un ciclo de 10' a 72°C en un termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Cada mezcla de reacción de 20 µl incluyó 2 µl de 10X Taq PCR Buffer, 1 µl de dimetil sulfóxido, 0.4 µl de deoxinucleósidos trifosfato 10 mM, 12 µl de cada primer 10 µM, 0.5 µl Taq polimerasa (Promega) y 3 µl de ADN genómico de las cepas. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% a 110 V durante 50 minutos.

### 6.5.4. Curva de crecimiento de cepa silvestre y modificada de *Vibrio LR6HC*

Se realizaron preinóculos en 10 ml en medio 10ml de medio LB 2% NaCl y se incubaron ambas cepas a 28°C, 130rpm de 12 a 16hr. Se centrifugaron los preinoculos a 8000g a 4°C y se lavaron tres veces con buffer de MgSO4 1M y se ajustó a una DO<sub>600</sub> de 0.5. Se inoculó 50 µl en 5 ml en medio óptimo. Se incubaron a las condiciones óptimas y se midió cada hora por un lapso de 16 horas, donde se establezca una fase estacionaria prolongada. Las curvas se realizaron por triplicado

## **6.6. EFECTO DE LA ANULACION EN PRODUCCION DE AHL EN VIBRIO LR6HC**

### **6.6.1. Producción de AHL en transconjugantes de *Vibrio* LR6HC**

Para evaluar la producción de AHL por parte de los transconjugantes, se realizaron pruebas presuntivas utilizando los diferentes biosensores anteriormente mencionados.

Además, se realizaron extracciones de AHL en las cepas modificadas, realizando una posible detección en placas de TLC utilizando los mismos biosensores.

Para una comprobación mas precisa acerca de la presencia de AHL producidas por las cepas modificadas de *Vibrio*, se utilizo el espectrómetro de masas para analizar los extractos en búsqueda de fracciones que correspondan a alguna posible AHL.

### **6.6.2. Detección de movilidad swarming en transconjugantes de *Vibrio* LR6HC**

Para demostrar la capacidad de desplazamiento swarming que presentan los transconjugantes de *Vibrio* LR6HC, se realizarón pruebas en placas semisólidas en diferentes medios anteriormente mencionados. Además, se observó la morfología colonial y células de las bacterias utilizando microscopia electrónica de barrido y de transmisión.

### **6.6.3. Detección y extracción de biosurfactante en transconjugantes de *Vibrio* LR6HC**

Se realizó una detección de biosurfactante a los transconjugantes de *Vibrio* LR6HC, en base a la prueba de la gota pendiente, anteriormente descrita. Además, se realizó una extracción de biosurfactante a estas bacterias, para determinar variaciones entre cepa silvestre y transconjugante.

#### **6.6.4. Efecto en la movilidad swarming del extracto de cepa silvestre en transconjugantes de *Vibrio* LR6HC**

Se realizó un ensayo para determinar el efecto del extracto de la cepa silvestre en los transconjugantes de *Vibrio* LR6HC. Los extractos con AHL se puntearon como anteriormente se describió. Se inoculó la bacteria en el sitio de punteo y se inoculó a las condiciones anteriormente descritas. Se tomó como control el solvente (acetato de etilo) para eliminar efecto de este.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Detección de AHL

#### 7.1.1. Prueba presuntiva de producción de AHL

Se realizaron pruebas presuntivas en placas para la detección de AHL en la cepa de *Vibrio* LR6HC, bacteria que fue aislada de la rizosfera del mangle negro (*Avicennia germinans*), utilizando las bacterias biosensoras *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* (pJZ372) (pJZ384) (pJZ410).

La cepa de *Vibrio* LR6HC, indujo una fuerte coloración tanto con la cepa *C. violaceum* como con *A. tumefaciens*. Con *C. violaceum*, la presencia colorimétrica se dió a las 8 horas de incubación, presentándose una línea tenue violeta que demuestra la producción de violaceina por parte de la bacteria biosensora, la cual fue incrementando la intensidad conforme aumento el tiempo de incubación, presentando una intensidad total, a las 16 horas de incubación. Esto demuestra que la cepa de *Vibrio* esta produciendo AHL y que estas se van incrementando hasta alcanzar un determinado quórum, en la cepa biosensora, a las 8 horas de incubación (Figura 1 a).

En el caso de biosensor *A. tumefaciens*, se indujo la coloración azul, que demuestra la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual rompe el substrato específico X-gal que se coloca al medio HGB. Esta respuesta colorimétrica, se presentó inicialmente después de las 14 horas de incubación, la cual fue avanzando muy lentamente, presentando una mayor intensidad después de las 28 a 32 horas, tiempo en el cual el substrato ya empieza a tornarse azul, por si solo. También a esta hora, la cepa de *Vibrio* empieza a presentar una coloración azul, la cual nos indica que esta bacteria produce enzima  $\beta$ -galactosidasa (Figura1 b).

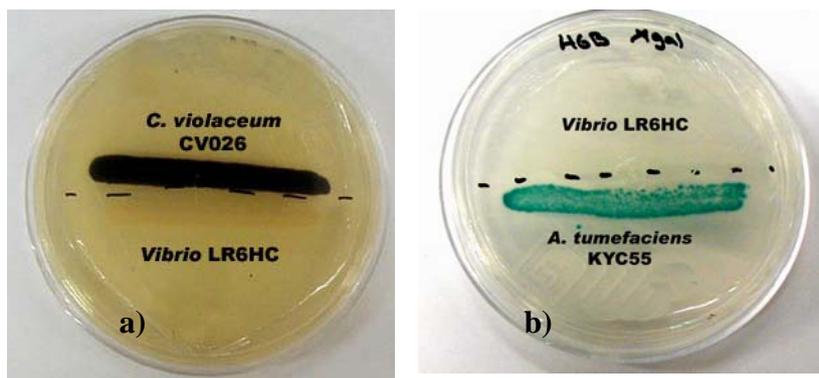


Figura 1. Producción de AHL en *Vibrio* LR6HC, a) *C. violaceum* CV026, b) *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ372) (pJZ384) (pPJZ410).

### 7.1.2. Extracción de AHL

Se obtuvieron extractos de AHL de la bacteria *Vibrio* LR6HC, utilizando el solvente acetato de etilo. Se obtuvieron aproximadamente 100 $\mu$ l de un inóculo bacteriano de 400 ml. El extracto fue probado en los 2 diferentes biosensores mencionados anteriormente, encontrándose en ambos, una respuesta colorimétrica que indica la presencia de AHL (Figura 2).

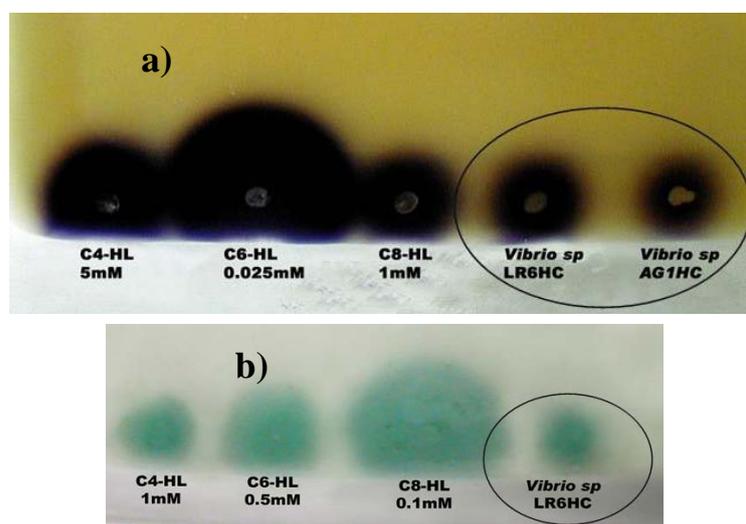


Figura 2. Detección de AHL en extractos de *Vibrio* LR6HC utilizando biosensores, a) *C. violaceum* CV026, b) *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ372) (pJZ384) (pPJZ410).

### 7.1.3. Identificación de AHLs por cromatografía en capa fina (TLC)

Los extractos de *Vibrio* LR6HC se corrieron en placas de silica gel, utilizando 2 diferentes biosensores para identificar la naturaleza de las moléculas señal. En las placas de TLC que fueron reveladas con *C. violaceum*, se encontró una cantidad considerable de molécula señal en las extracciones a las 12 y 24 h. El Rf del extracto comparado con los Rf de los estándares sintéticos indicó que la cepa de *Vibrio*, produjo principalmente 4C-HSL y 6C-HSL, con cantidades más altas de 4C-HSL (Figura 3a).

Con las placas de TLC que fueron reveladas con *A. tumefaciens*, se identificaron por lo menos 3 diferentes AHLs, comparando con los Rf de los estándares. Se observó en los extractos, la presencia de una molécula con un Rf similar a la molécula de 8C-HSL, no presente en el revelado con el anterior biosensor. Aparte de la molécula de 8C-HSL, se presentaron 2 moléculas que pudieran corresponder, comparado con los Rf de los estándares, a las moléculas 4C-HSL y 6C-HSL. Se ha reportado que *A. tumefaciens* es sensible a moléculas señal de cadena corta y con substituciones, por lo que la presencia de la molécula de 8C-HSL es comprensible (Figura 3b).

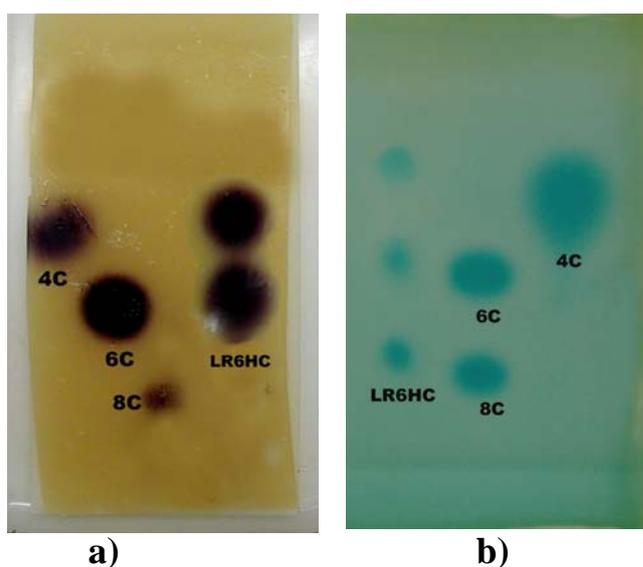


Figura 3. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos de AHLs de *Vibrio* LR6HC, a) *C. violaceum* CV026, b) *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ372) (pJZ384) (pPJZ410).

#### **7.1.4. Identificación de AHL por espectrometría de masas**

Se analizaron los extractos de *Vibrio* LR6HC utilizando un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas (GC/MS), detectando la presencia, en el extracto de 24 horas de crecimiento, de 4C-HSL, confirmando lo observado en la TLC. No hubo una cuantificación. Las moléculas de 6C-HSL y 8C-HSL identificadas en TLC no fueron detectadas en el espectrograma. Además de la molécula de 4C-HSL, se detectaron en los extractos ácido palmítico, ácido esteárico y la presencia de DKPs, moléculas inhibitorias del quórum sensing (Figura 4).

### **7.2. DETECCIÓN DE MOVILIDAD SWARMING EN *VIBRIO* LR6HC**

#### **7.2.1. Detección de desplazamiento swarming en placa petri**

Se detectó un desplazamiento tipo swarming en *Vibrio* LR6HC, en diferentes placas de medio cultivo semisólido (Figura 5). Se encontró que la proporción de agar (0.7%) y la presencia de los ácidos casamino fue clave para el desplazamiento, pues son condiciones que la bacteria necesita para realizar una avanzada. Se encontró la movilidad más característica a los patrones descritos para desplazamiento swarming (Harshey, 1998), en las placas de LB 2% NaCl semisólido (0.7%) suplementado con ácidos casamino 0.6%. Se observó que después de haber inoculado en el centro de la colonia, la migración presentó diferentes etapas en las avanzadas sobre la superficie de la placa. Primero, se formó el establecimiento de una típica colonia bacteriana, parecida a las que crecen en placas de medios sólidos. Después esta colonia, a las 8 horas de incubación, empieza a presentar las primeras avanzadas, de una manera radial y translúcida. Esta avanzada gradual, a través de la placa, adquiere una forma característica en “oleadas”, como lo reportan *S. liquefaciens*. Se estimó, que la avanzada fue de aproximadamente 1mm cada hora, encontrándose que después de las 5

o 6 horas de desplazamiento inicial, este tiempo disminuyó considerablemente, llegando a ser de tan solo 0.1mm cada hora. Se encontró además, que el desplazamiento de la

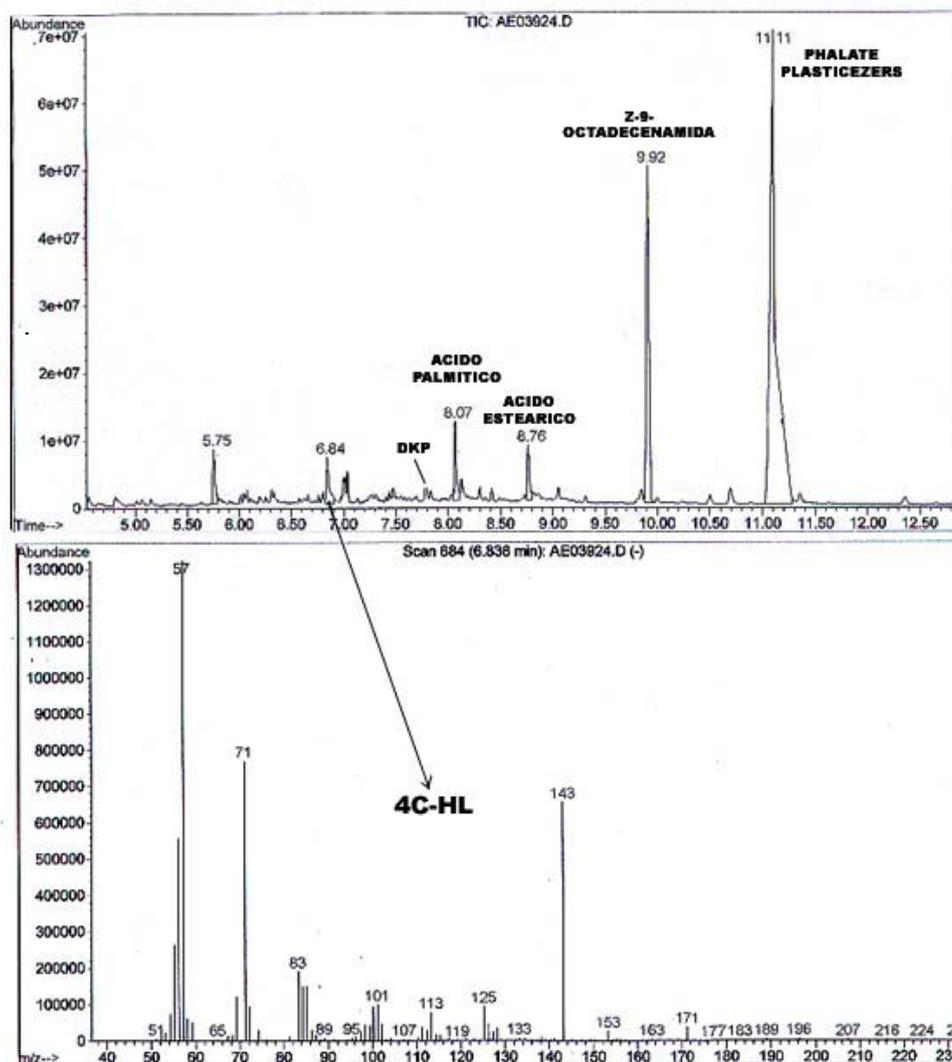
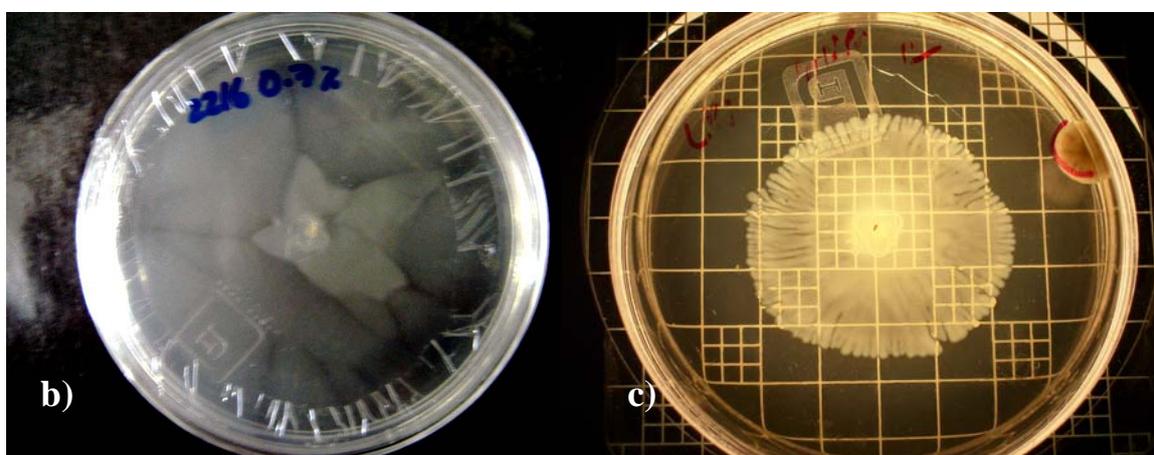


Figura 4. Caracterización de la molécula 4C-HSL obtenida del sobrenadante de *Vibrio* LR6HC extraído en acetato de etilo

colonia bacteriana, fue de manera superficial, encontrándose la producción de una sustancia de consistencia mucoide, que a manera de película cubría este desplazamiento (Figura 5a). Con respecto al desplazamiento en los otros medios de cultivo, se encontraron variaciones al tipo de desplazamiento mencionado anteriormente. Se encontró en placas semisólidas de medio marino 2216, un desplazamiento de apariencia “estelar” con avanzadas no uniformes y la presencia de septos, que marca diferentes avanzadas sobre la placa. Se encontró que los tiempos de desplazamiento fueron mas

cortos, llegado a ser de hasta 2mm por hora, en los primeros tiempos de inoculación. La diferencia más marcada fue que el desplazamiento de la colonia no fue superficialmente, si no por dentro de la película de agar, aproximadamente 0.5cm de la superficie. Este tipo de desplazamiento no se ha reportado hasta la fecha para alguna bacteria (Figura 5b). Se observó en el desplazamiento en placas de medio HGB semisólido, suplementado con glicerol y glucosa, que las fuentes de carbono eran el detonante para la avanzada. No se presentó avanzada de la colonia en placas de medio HGB suplementado con glucosa 0.5% las colonias solo presentaron crecimiento en volumen, pero sin presentar un rastro de movilidad, aunque las condiciones semisólidas estaban presentes. Al contrario, en placas de medio HGB suplementado con glicerol 0.5%, se presentó una avanzada similar a la que presenta la colonia en medio LB 2%. La bacteria mostró un desplazamiento en oleadas, presentando en apariencia, características típicas de la migración swarming. Después de las 8 horas de inoculación y después de presentar una avanzada en oleadas, el desplazamiento de la colonia adquirió una forma radicular, y el tiempo de avanzada disminuyó, de 1mm a 0.5mm por hora. Esta avanzada radicular ha sido reportada para las bacterias *E.coli* y *Bacillus* (Matsuyama, 1988) (Figura 5c).



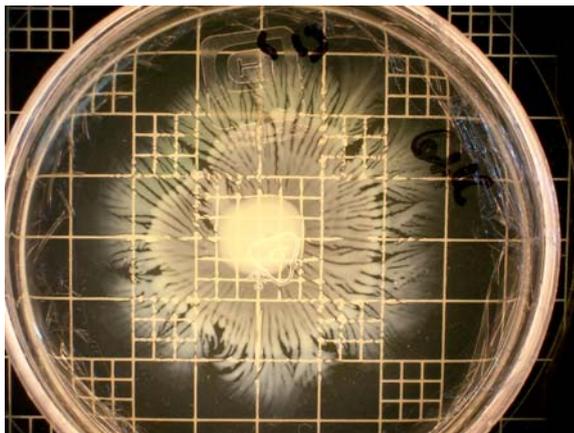


Figura 5) Desplazamiento swarming observado en *Vibrio* LR6CH detectado en diferentes medios semisólidos 0.7% agar, a) LB 2% NaCL, b) medio marino 2216, c) HGB suplementado con glicerol 0.15% todos los medios presentan ácidos casamino, como fuente de energía.

### 7.2.2. Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Se realizaron observaciones del desplazamiento swarming que presentaba la cepa de *Vibrio* LR6HC en medio semisólido, utilizando el microscopio electrónico de barrido. Se observó como las avanzadas de la colonia, presentaban recubrimiento de una película, la cual no permitió observar con mayor nitidez la forma ni el arreglo de las células (Figura 6a). Además, se observó perfectamente como se presentaban avanzadas en una forma radicular, presentando ramificadas desde el centro de la colonia. Además, se encontró que también el centro de inoculación presentaba el recubrimiento de la película, diferenciándose grandemente con respecto al aspecto que presenta la colonia crecida en medio sólido (Figura 6b) y observada en SEM. Tanto las preparaciones del medio como de la periferia de la avanzada, nos demostró la presencia de desplazamientos en forma ramificada y recubierta de película. Desgraciadamente no se pudo observar la morfología de las células en la avanzada, por el tipo de preparación observada. En preparaciones realizadas a colonias crecidas en medios sólidos, no se observa presencia de película que cubriera las bacterias, pues estas se observaron y se

encontró que presentaban una morfología típica de *Vibrio*, con forma bacilar y la presencia de flagelos polares.

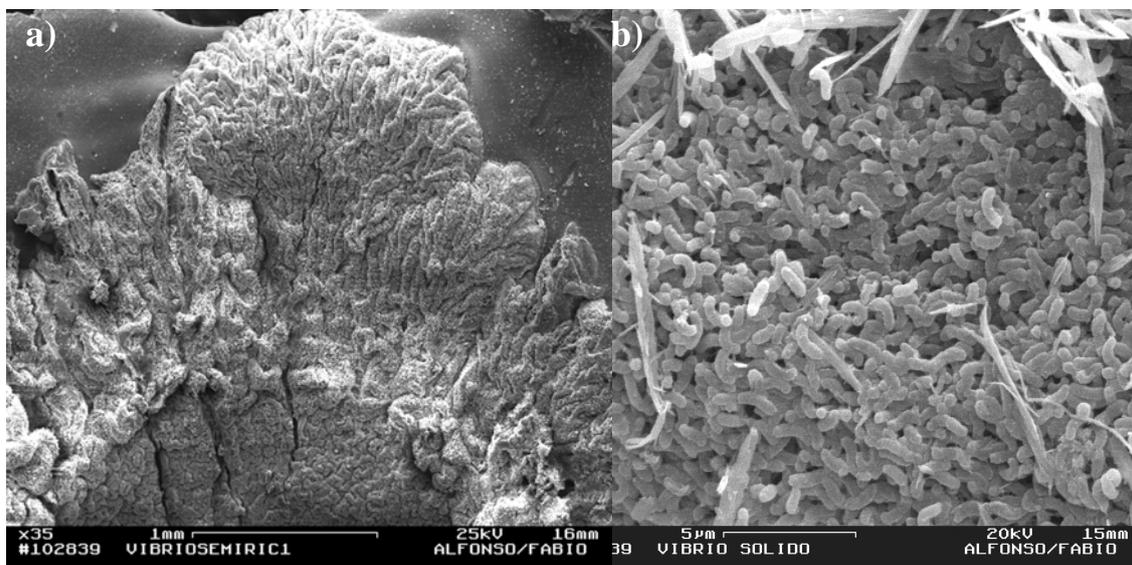


Figura 6. Microscopia electrónica de Barrido en colonias de *Vibrio* LR6HC, donde se aprecia la morfología que presenta las colonias creciendo en condición a) semisólida, b) sólida. Se observan patrones que puede presentar una colonia en plena migración, mientras que la otra son células vegetativas.

### 7.2.3. Microscopia electrónica de Transmisión (TEM)

Se utilizó el TEM para realizar observaciones mas precisas y con mayor nitidez, acerca del desplazamiento que presenta la cepa de *Vibrio*. Antes de realizar las observaciones en TEM, se observaron en microscopio óptico, cortes semifinos de la muestra, para buscar un mejor área que nos permitiera una mejor observación del comportamiento del desplazamiento de la colonia (Figura 7). En estas preparaciones, se observó el estado integro que guarda la colonia inicial de migración, con una cantidad de células considerable con arreglos muy marcados. A partir de esta colonia, se observa como existe en la parte más superficial, avanzadas ligeras sobre la capa de agar, con células que presentan una forma mas alargada a las presentes en el centro. Se nota como se hace mas pequeña la película de avanzada, hasta solo presentar en la parte mas distal,

algunas células, que algunos autores llaman, “de reconocimiento del estrato” (Harshey, 1998).

Se observa además, por debajo de la capa de agar, grandes avanzadas que invaden porciones considerables de agar, dando el aspecto de “estratos dérmicos”, por las diferencias que presentan las agrupaciones de bacterias. Además de estas agregaciones se detecta la presencia de sustancia de naturaleza mucopolisacárida (Olivares, 2006, comunicación personal), en forma de redes, en la parte media y mas profunda de agar (Figura 7a). Se compararon las preparaciones anteriores con preparaciones de colonias sólidas, donde no solo se observó en la colonia, un crecimiento en cantidad de células, que se presentaban apiladas, pero sin existir una avanzada, ni una invasión al interior del agar (Figura 7b).

Se observaron en TEM, los cortes ultrafinos de las preparaciones anteriores para determinar la morfología que presenta las bacterias en migración swarming (Figura 8). Las células swarmer de *Vibrio* presentaban un alargamiento marcado, con un tamaño que osciló entre 1.5 y 1.8  $\mu\text{m}$  de largo, además presentó una serie de flagelos laterales, además del flagelo polar existente (Figura 8a). Se alcanzaron a observar asociaciones entre estas células, entrelazando los flagelos laterales para formar apilamientos que simulan un arreglo típico de biofilms. Se observó en las células de la colonia sólida, un aspecto normal de la bacteria, con un tamaño entre 0.7 y 0.8  $\mu\text{m}$  de largo, con la presencia de tan solo un flagelo polar largo, utilizado como propulsor en el nado (Figura 8b).

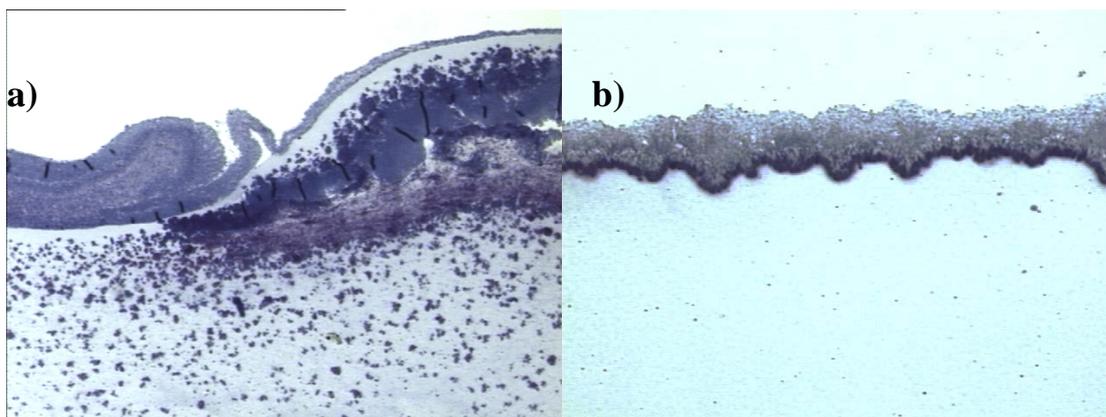


Figura 7. Preparaciones semifinas para TEM, observadas en microscopio óptico 40X donde se aprecia la morfología que presenta las colonias creciendo en condición a) semisólida, b) sólida. Se observa un patrón de migración por debajo de la capa de agar.

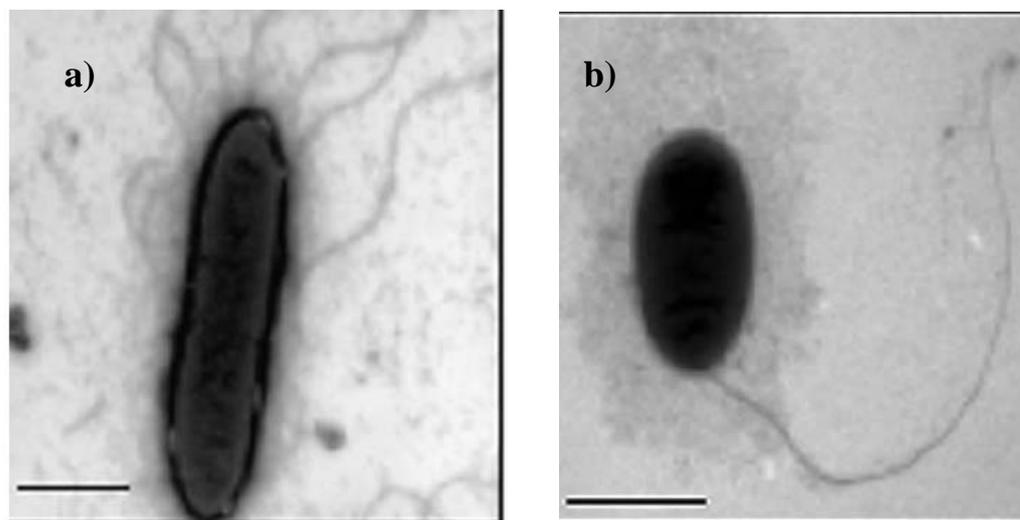


Figura 8. Observación de morfología de células de *Vibrio* LR6HC utilizando microscopía electrónica de Transmisión en condición a) semisólida, b) sólida. La barra mide 0.6  $\mu\text{m}$ .

#### 7.2.4. Efecto de las AHL sintéticas en el swarming de *Vibrio* LR6HC

Se observó un efecto sobre el desplazamiento de la cepa de *Vibrio* LR6HC, al presentarse múltiples migraciones con respecto al centro. En algunos casos, se perdió la formación de septos, muy marcados en la cepa silvestre (Figura 9). Los efectos más notorios fueron al usar 4C-HL y 6C-HL (Figuras 9a y 9b), en las cuales, el tiempo de migración, fue de casi 2 mm por hora, después de una etapa de consolidación corta y

alcanzado el borde de la placa, cercanas las 24 horas, en comparación a la cepa silvestre, que la alcanzo a las 28 horas. Se comprobó el efecto de las AHL al observarse en el control con el solvente acetato de etilo, una apariencia normal de desplazamiento swarming, anteriormente comentada.

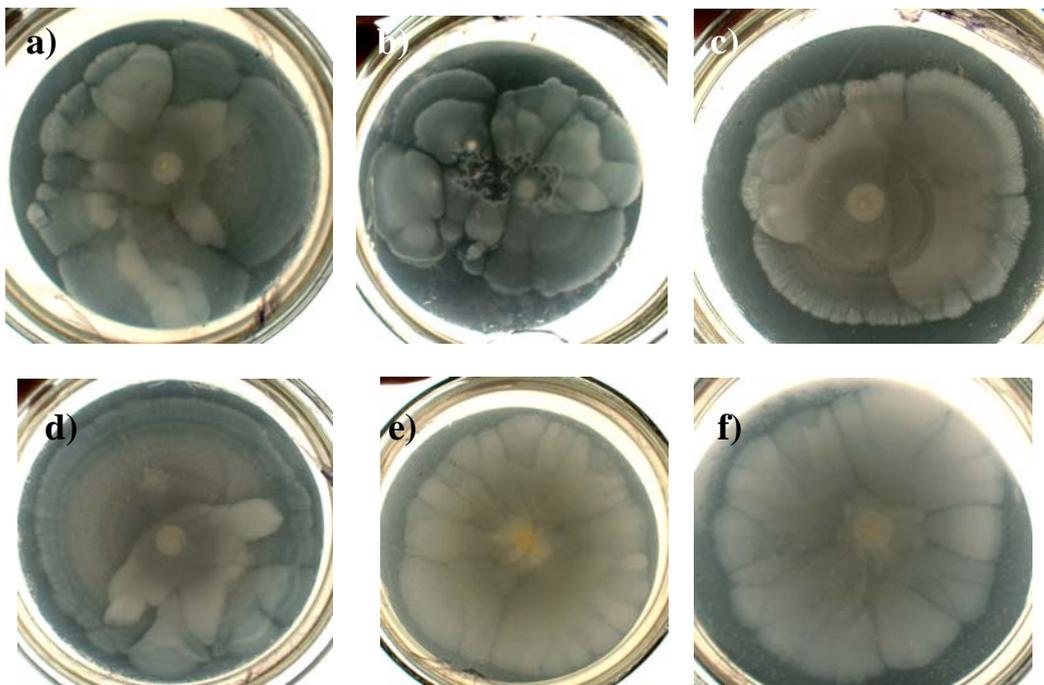


Figura 9. Desplazamiento swarming por el efecto de AHLs sintéticas en *Vibrio* LR6HC. a) 4C-HL, b) 6C-HL, c) 8C-HL, d) Extracto de AHLs de *Vibrio* LR6HC, e) control con acetato de etilo, f) condición de migración normal.

### 7.3. ALTERACIÓN EN PRODUCCIÓN DE AHLs

#### 7.3.1. Obtención de transconjugantes

Para observar el efecto real de las AHLs en la cepa de *Vibrio* LR6HC, se realizó una conjugación con la cepa *E.coli* S17, la cual presentaba en un plasmido pDSK519, el gen *aiiA*, aislado de *Bacillus anthracis*, que codifica para una AH lactonasa. Esta enzima tiene la capacidad de degradar las AHLs que produce la cepa de *Vibrio*, produciendo un estado análogo a una mutación, en las bacterias transconjugadas, permitiendo evaluar el fenotipo de interés y determinar la participación que guarda esta

molécula en la regulación de la misma. Se obtuvieron buena cantidad de bacterias transconjugantes, que asimilaron exitosamente el plasmido, logrando crecer en medio con kanamicina. Se obtuvo un porcentaje de conjugación del 2.3%, obteniendo este dato en base a los controles.

### **7.3.2. Extracción de DNA plasmídico y PCR de gen *aiiA***

Se realizaron extracción de DNA plasmidico tanto a las cepas silvestres y modificada (-AHL) de *Vibrio* LR6HC como a la cepa donadora *E. coli* S17 pDSK519, obteniendo una cantidad de 50µl de DNAP de buena calidad para cada una de las cepas.

Se les realizó una PCR a los DNAP para verificar la presencia de los genes *aiiA*, confirmándose la presencia de estos genes al amplificar los fragmentos tanto en la cepa de *Vibrio* LR6HC*aiiA*, como en *E. coli* S17 (Figura 10). Los fragmentos amplificados fueron de aproximadamente de 900 pb, obteniendo este valor a través de comparación con la escalera de peso molecular. Como se esperaba, no se presentó amplificación en el DNAP de la cepa silvestre de *Vibrio* LR6HC, confirmando la ausencia de estos genes (Figura 10).

### **7.3.3. Curvas de crecimiento**

Se realizaron curvas de crecimiento para descartar algún efecto en la fisiología de las bacterias por la introducción del vector en la cepa modificada y silvestre de *Vibrio*. Se observó que no hubo una variación drástica en su cinética de crecimiento en un periodo de 16 horas (Figura 11). Esto demuestra que la introducción del plasmido pDSK519*aiiA* no provoca efectos negativos en el crecimiento de la cepa no productora de AHL, en comparación con la cepa silvestre

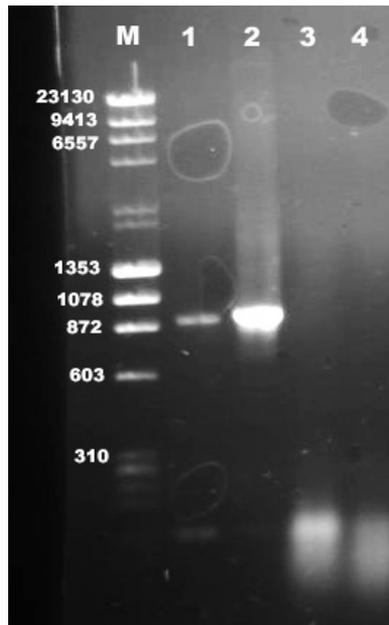


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación por PCR del gen *aiiA*. M, marcador; 1 *Vibrio LR6HcaiiA*; 2 S17 (pDSK519*aiiA*); 3 *Vibrio LR6HC*; 4 control negativo.

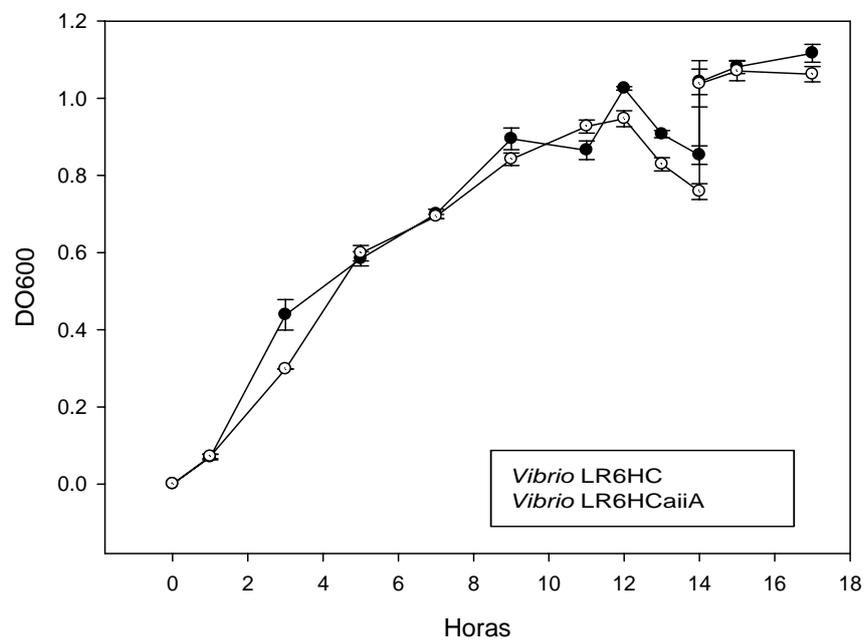


Figura 11. Curva de crecimiento de *Vibrio LR6HC* y su transconjugante LR6HcaiiA. Las barras corresponden a error estándar

### 7.3.4. Efecto de la enzima AiiA en la producción de AHLs

#### 7.3.4.1. Prueba presuntiva de producción de AHL en *Vibrio* LR6HC*aiiA*

Para demostrar la eficiencia de la enzima AHL lactonasa en la degradación de las AHL producidas por la misma cepa de *Vibrio*, se realizaron pruebas presuntivas con los biosensores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* KYC55 (Figura 12). Se observó que en la cepa transconjugante de *Vibrio* LR6HC*aiiA* no indujo una respuesta positiva al utilizar los biosensores, lo cual indica que la AHL lactonasa codificada por el gen *aiiA*, es eficiente en la degradación de las diferentes AHLs producidas por *Vibrio* LR6HC.

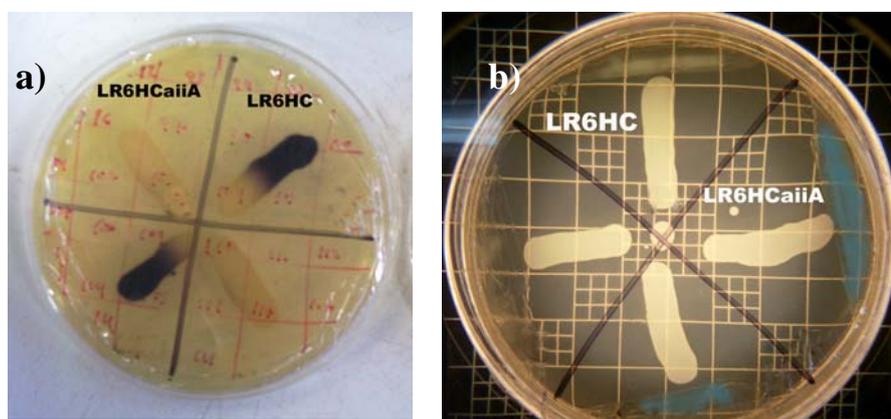


Figura 12. Detección de AHL en placas en *Vibrio* LR6HC y LR6HC*aiiA* usando los biosensores a) *C. violaceum* CV026; b) *A. tumefaciens* KYC55

#### 7.3.4.2. Extracción de AHLs e identificación en cromatografía de capa fina (TLC)

Se realizaron extracciones de AHL a las cepas de *Vibrio* LR6HC y LR6HC*aiiA* a las 24 horas de crecimiento. Se encontró que los extractos de la cepa LR6HC*aiiA* no produjeron ninguna señal en las placas utilizando ambos biosensores (Figura 13). Lo anterior nos demuestra la eficiencia de la AHL lactonasa, al degradar las AHLs producidas por la cepa silvestre a un nivel no detectable por los biosensores.

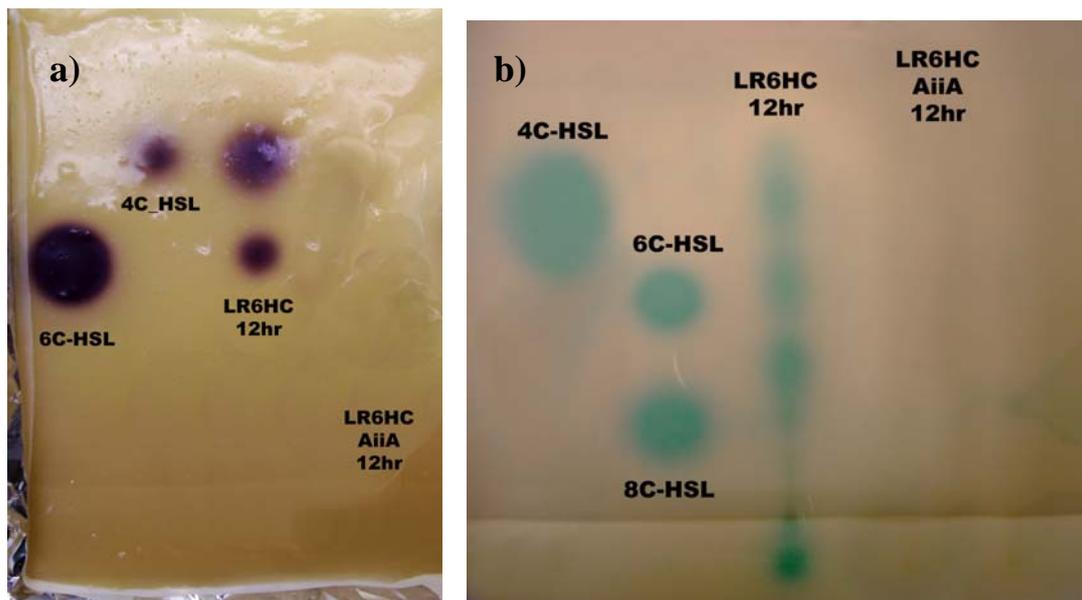


Figura 13. Cromatografía de capa fina de AHLs de *Vibrio* LR6HC y LR6Hc*aiiA* extraídas en acetato de etilo y observadas en los biosensores a) *C. violaceum* CV026 b) *A. tumefaciens* KYC55.

#### 7.3.4.3. Detección de producción de AHL por espectrometría de masas

Se analizaron los extractos de *Vibrio* LR6Hc*aiiA* por espectrometría de masas, el cual no detectó presencia de ningún tipo de AHLs en comparación a los extractos de LR6HC, demostrando la óptima eficiencia de la enzima, al degradar completamente las AHLs producidas por *Vibrio* LR6HC (Figura 14).

#### 7.3.5. Efecto de la enzima AiiA en desplazamiento swarming

##### 7.3.5.1. Desplazamiento swarming en *Vibrio* LR6Hc*aiiA*

Se observó una incapacidad por parte de la colonia de *Vibrio* LR6Hc*aiiA* para presentar desplazamiento swarming, en placas semisólidas de 3 diferentes medios de cultivo. El aspecto de la colonia no migrante, presentó similitud con el visto anteriormente en las colonias que crecen en medio sólido (Figura 15). Se observa un

aumento en el volumen de la colonia, la cual crece formando un “domo”, pero no existe-

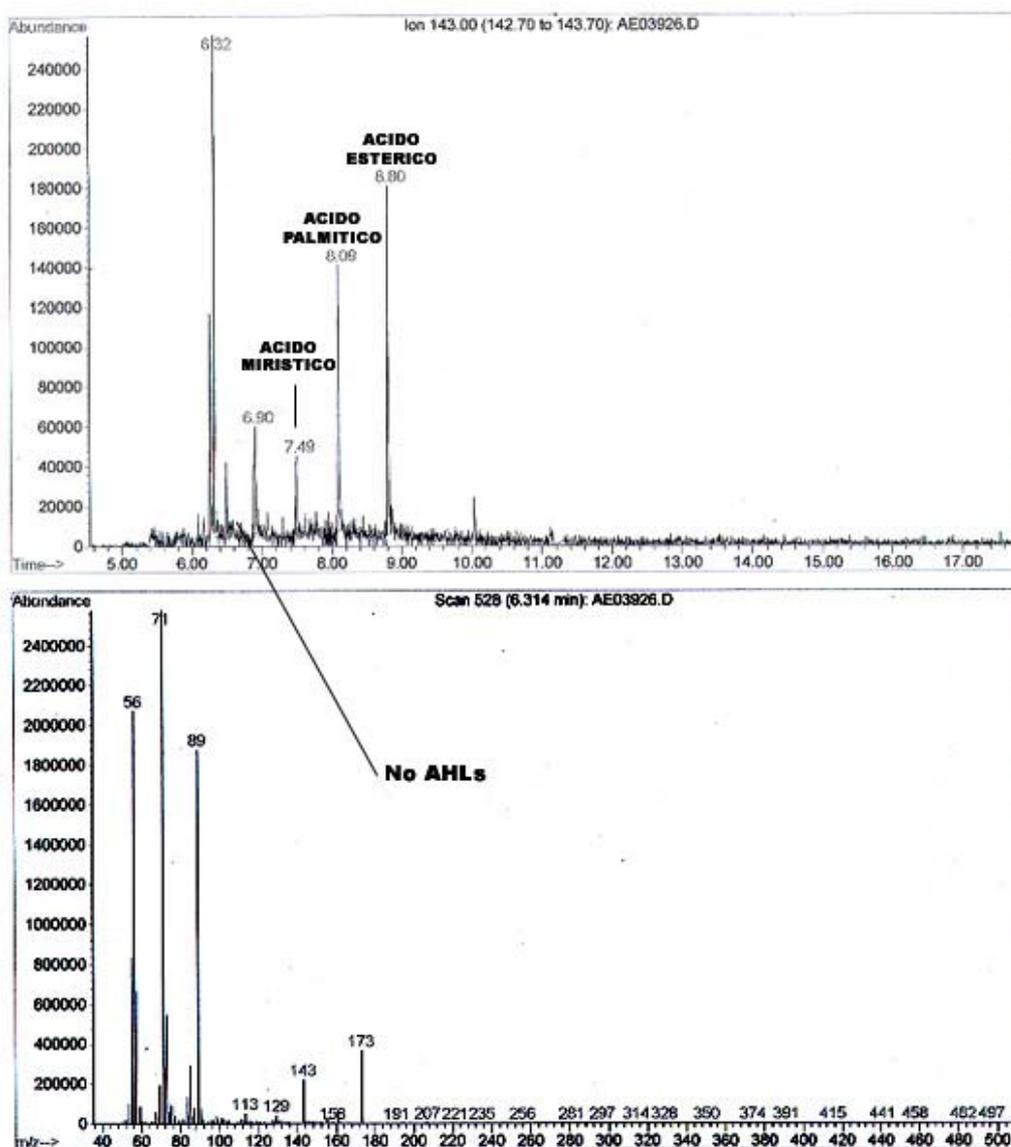


Figura 14. Caracterización del extracto del sobrenadante de la cepa transconjugante *Vibrio* LR6HCaiiA extraída en acetato de etilo. Se observa la ausencia de AHL en el extracto.

el indicio de que la bacteria pudiera presentar una avanzada. Este resultado nos puede indicar que la ausencia de AHL dentro de la colonia bacteriana ya consolidada no permite que las bacterias alcancen este fenotipo.

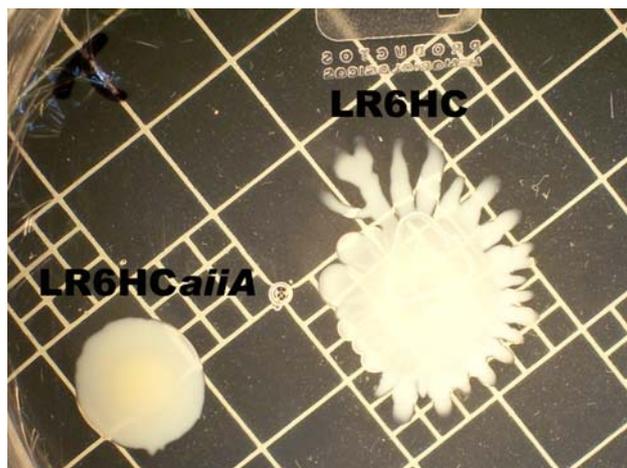


Figura 15. *Vibrio* LR6HC y LR6HC*aiiA* creciendo en placa semisólida 0.7%, donde se observa incapacidad de desplazamiento por la cepa transconjugante.

#### 7.3.5.2. Microscopia electrónica de Barrido (SEM)

Se observó, que la morfología que presentaban las células de *Vibrio* LR6HC*aiiA* era muy similar a la que presenta las células que crecen en medio sólido, explicado anteriormente. Las bacterias carecen de una película que los cubra, presentan un flagelo polar, largo. No presentan patrón determinado de arreglo, sin embargo mantuvieron cierto acomodo unas con otras (Figura 16).

#### 7.3.5.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Se comprobó efectivamente que la morfología de las células de *Vibrio* LR6HC*aiiA* correspondía a una célula vegetativa, de tamaño normal, flagelo polar y sin una cubierta que no permitiera observarla (Figura 17)

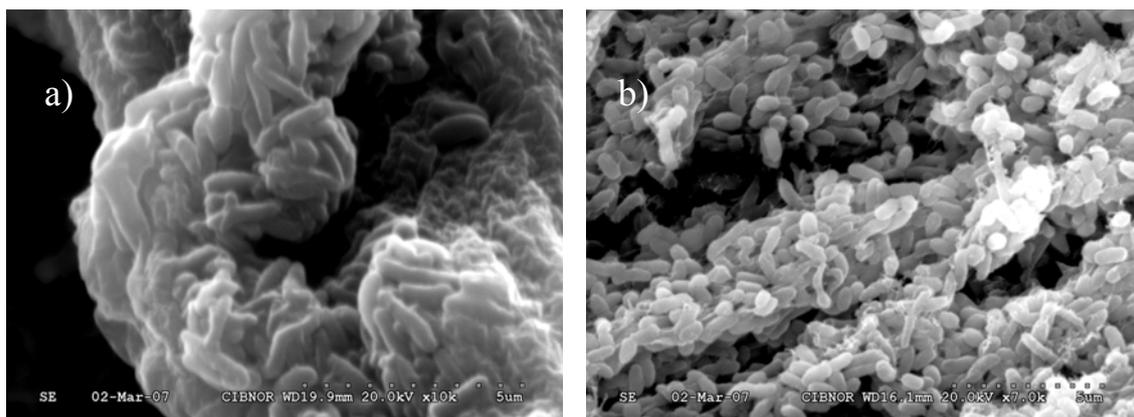


Figura 16. Observación en microscopía electrónica de barrido de colonias de a) *Vibrio* LR6HC y b) LR6HC*aiiA* en placas semisólidas.

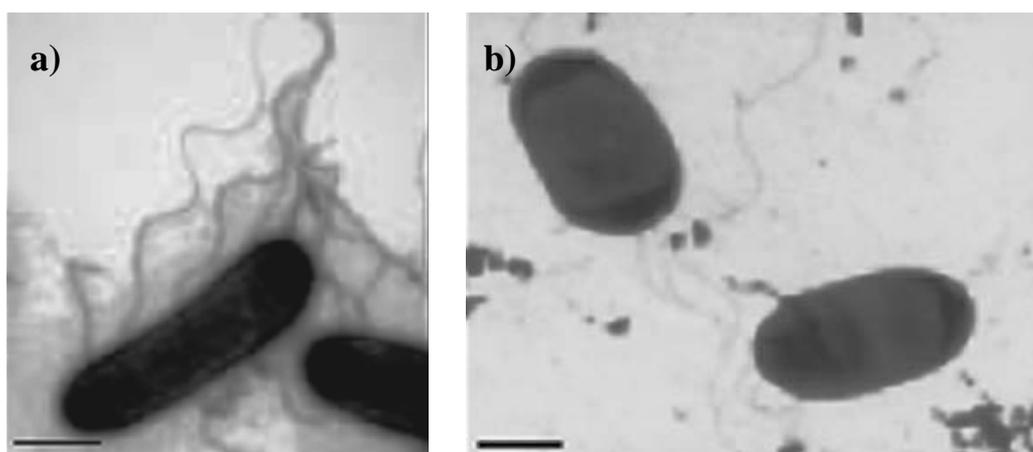


Figura 17. Observación en microscopía electrónica de transmisión, de células de *Vibrio* LR6HC y LR6HC*aiiA* en placas semisólidas. Las barras miden 0.6  $\mu$ m.

#### 7.3.5.4. Detección de biosurfactante-prueba de la gota de agua

Se detectó la presencia de biosurfactante en cultivos de 8, 12 y 16 h de incubación en cepas de *Vibrio* LR6HC. Se observó que la gota de agua se expandió sobre la placa de plástico al momento de añadirle el cultivo bacteriano. En contraste, no se observó esta expansión de la gota en la cepa modificada de LR6HC*aiiA*, si no al

agregarle una cantidad de biosurfactante extraído directamente de la cepa LR6HC (Figura 18).

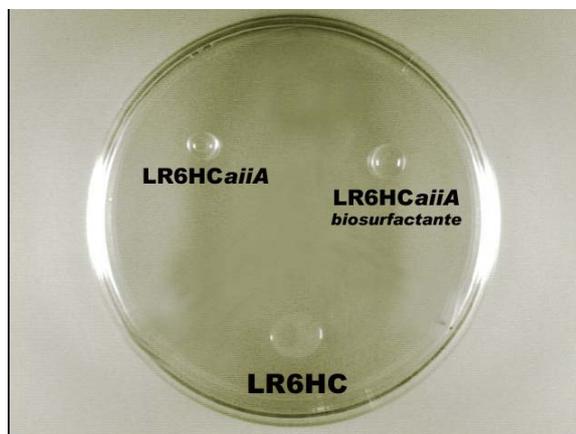


Figura 18. Prueba de la gota pendiente en *Vibrio* LR6HC y LR6HCciiiA. Se observa además el efecto del biosurfactante extraído de LR6HC en la cepa modificada.

#### 7.3.5.5. Detección de Biopelículas formadas por *Vibrio* LR6HC

Se determinó la capacidad de la cepa modificada *Vibrio* LR6HCciiiA, en la formación de biopelículas, encontrándose una disminución de más del 50%. La bacteria modificada presentó menor capacidad de adherirse a los tubos de borosilicato, desprendiéndose a veces por completo, con los lavados. La cepa silvestre, mostró una buena adherencia en estos tubos, presentando formación de biopelícula desde las 16 horas de incubación (Figura 19).

#### 7.3.5.6. Extracción de Biosurfactante en *Vibrio* LR6HC

Se realizó una extracción de biosurfactante tanto a la cepa silvestre LR6HC y la modificada LR6HCciiiA. El biosurfactante recuperado fue cuantificado a OD<sub>570</sub>, presentando una mayor producción en la cepa silvestre que en la cepa modificada, en la cual la cantidad disminuyó hasta en un 95% (Figura 20).

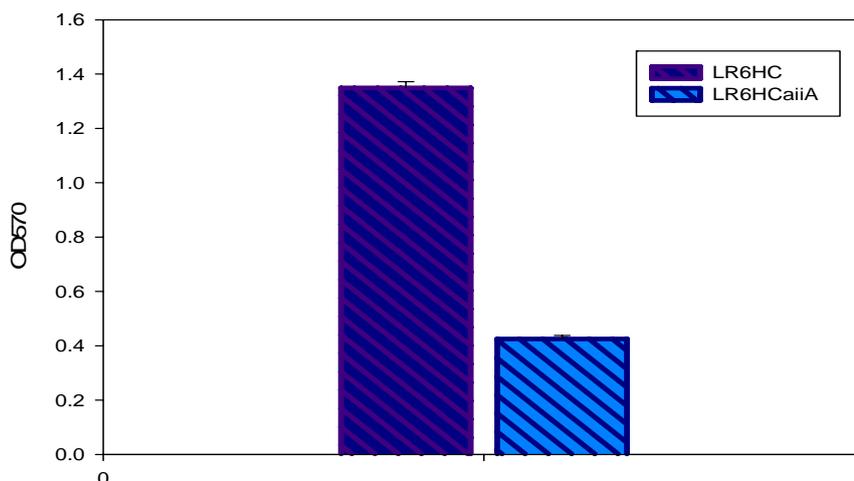


Figura 19. Cuantificación de formación de biopelículas en *Vibrio* LR6HC y LR6HCaiiA. Se observa disminución del 60% en cepa modificada.

#### 7.3.5.7. Efecto del extracto de la cepa *Vibrio* LR6HC en la movilidad de LR6HCaiiA

Se observó el efecto de las AHL presentes en el extracto de la cepa de *Vibrio* LR6HC al devolverle la movilidad a la cepa LR6HCaiiA. El tipo de desplazamiento que presenta es similar al que presenta la cepa silvestre en las primeras horas de crecimiento, presentando solo un tiempo de migración de 0.5mm por hora. Después, la migración cesó, solo presentando un tiempo de migración de alrededor de 0.15mm por hora. Se determinó que la concentración del extracto era clave, para que la migración continuara por más tiempo (Figura 21).

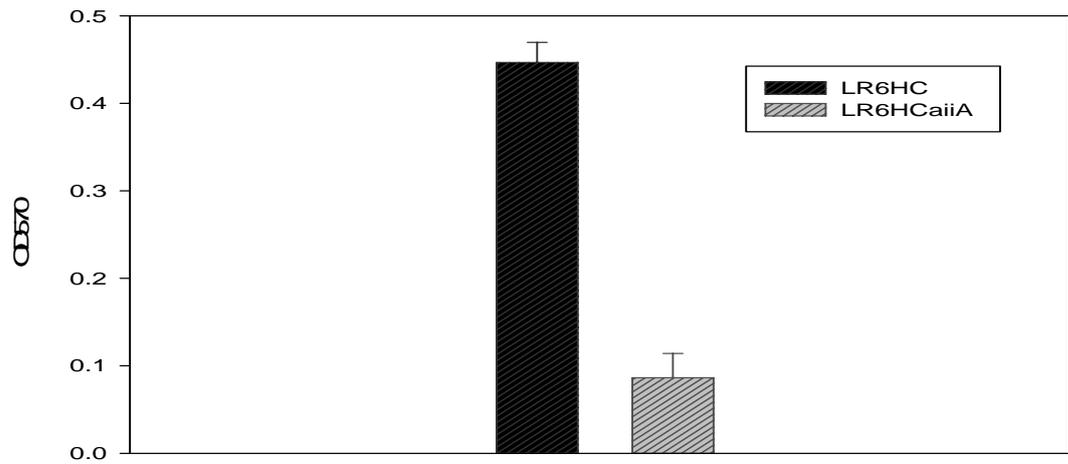


Figura 20. Cuantificación de biosurfactante en *Vibrio* LR6HC y LR6HCaiiA. Se observa disminución de hasta un 90% en la cepa modificada.

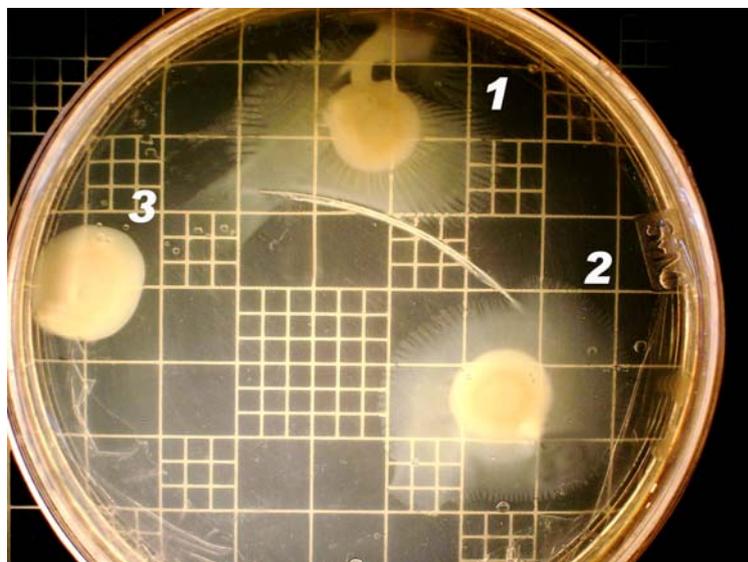


Figura 21. Efecto de AHLs en cepa modificada de *Vibrio* LR6HCaiiA.  
 1) LR6HC; 2) LR6HCaiiA mas extracto de AHLs; 3) LR6HCaiiA

## VIII. DISCUSION

### 8.1. Identificación de AHLs

Las bacterias tienen que desarrollar mecanismos de regulación de genes que accionen la detección y respuesta en varias condiciones ambientales, incluyendo la presencia de competidores y hospederos, ya sean plantas o animales. En varios casos, la expresión de genes puede ser dependiente de que la bacteria alcance un tamaño de población específica y por lo tanto en la habilidad de la bacteria a detectar la densidad poblacional.

Además, el reconocimiento de la regulación de genes mediante AHL es a menudo un componente de muy complejas redes de traducciones de señales las cuales sugieren que el QS no funciona independientemente, pero es controlada a si misma por factores ambientales y/o fisiológicos.

El sistema de regulación por QS se caracterizó por primera vez en bacterias como *V. fischeri* y *V. harveyi*. (Pearson *et al*, 1994). A partir de entonces se han descrito un número creciente de sistemas de regulación por QS tanto en bacterias Gram-negativas (Fuqua *et al*, 2001) y Gram positivas (Millar y Bassler *et al*, 2001), como en benéficos (Gonzalez y Marketon, 2003) y patógenos de plantas y animales (Von Bodman *et al*, 2003). La presencia de los sistemas de regulación por QS en tal cantidad y diversidad de organismos podría deberse a que se trata de un mecanismo que permite a estos microorganismos coordinar su comportamiento para adaptarse a los cambios continuos que se producen en el medio (Fuqua *et al*, 2001; Millar y Bassler *et al*, 2001; Shiner *et al*, 2005).

El uso de biosensores para la detección de AHLs ha sido un instrumento para el descubrimiento de nuevas bacterias Gram negativas aisladas de ambientes naturales que utilizan el sistema QS para regular ciertos procesos fisiológicos. Existen diferentes tipos

de AHLs que varían en lo largo de la cadena acilo y tienen diferentes perfiles de activación por cada homólogo de LuxR, incitando la construcción de reporteros detallados, que responden a diferentes tipos de estructuras que presentan las AHLs. Estos biosensores pueden usarse en una serie de experimentos para caracterizar las señales de AHL involucradas en el QS en una variedad de organismos. Simples ensayos de detección con asadas en forma de “T” o pruebas en diferentes medios condicionantes pueden ser usados para determinar la producción de moléculas autoinducidas producidas por un determinado organismo. En este trabajo, la cepa silvestre de *Vibrio* LR6HC, pudo ser capaz de inducir la detección de AHL en los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* KYC55. Estos biosensores, son específicos para un determinado tipo de molécula señal. *C. violaceum* CV026 es una cepa mutante que es incapaz de producir algún tipo de molécula señal, pero responde a la presencia de AHLs exógenas, siendo extremadamente sensible a AHLs tanto de cadena corta como media (4C, 6C y 8C-HL). Esta cepa detecta en mayor intensidad la presencia de la molécula 4C-HL pero no detecta moléculas señal de cadena larga o con alguna sustitución tipo Oxo (McClellan *et al*, 1997). En tanto que *A. tumefaciens*, detecta un amplio rango de AHLs (cadena corta, cadena larga, con sustituciones, etc). Los genes *tra*, *lux* y *las*, que codifican para un homólogo de LuxR, se unen con las AHLs exógenas, regulando así la región promotora del gen *lacZ*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La acción degradadora de la enzima hacia un sustrato ocasiona la respuesta colorimétrica (Cha *et al*, 1998).

La extracción de AHLs de sobrenadantes de cultivos bacterianos usando solventes orgánicos como acetato de etilo o diclorometano pueden superar estos problemas y son usados para concentrar cualquier molécula de AHL presente en diversos grupos bacterianos (Cha *et al*, 1998).

La técnica de TLC, junto a la detección de un bioreportero, provee una simple y rápida técnica para determinar la mayor cantidad de diferentes AHLs producidas por una variedad amplia de organismos (Shaw, 1997). La técnica también proporciona información preliminar acerca de la naturaleza de estos compuestos presentes en los extractos de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos. Utilizando esta técnica, se detectaron 2 diferentes tipos de AHLs (4C y 6C), producidos por la cepa LR6HC, con el biosensor CV026. Este resultado contrasta con el presentado por Shaw y colaboradores (1997), los cuales demostraron que CV026 es capaz de detectar en sobrenadantes de *P. aeruginosa* la molécula de 8C. Sin embargo, la causa por la cual la molécula de 8C no se detectó, indica que la concentración de la molécula en el sobrenadante de LR6HC es realmente bajo para la detección con este biosensor.

Utilizando el biosensor KYC55, se detectó 3 diferentes moléculas, que correspondían por su velocidad de migración ( $R_f$ ), a las moléculas de 4C, 6C y 8C, esto comprobado con los estándares sintéticos. Estos resultados se comparan con los presentados por Cha y colaboradores (1998), donde detectaron las mismas AHLs en *P. fluorescens* o *Xhantomonas oryzae*, con ayuda de este biosensor.

Además, se observó la presencia de una concentración elevada de molécula 4C-HL, lo cual nos hace suponer que esta molécula está siendo producida en grandes cantidades, quizás regulando genes, en ese determinado tiempo de crecimiento.

Sin embargo, no puede asignarse la estructura de las moléculas señal basándose solamente en las propiedades cromatográficas.

No obstante, los extractos de la cepa LR6HC analizados por GC/MS confirmaron lo observado en la técnica de TLC, sobre la presencia de la molécula 4C-HL en los sobrenadantes; mientras que la presencia de las moléculas 6C-HL y 8C-HL no pudieron ser detectadas. Una posible causa pudiera ser que las muestras se analizaron

directamente por GM/MS sin realizar antes una fragmentación del extracto en base al uso del HPLC, y por lo tanto, los compuestos que se encontraban en menores concentraciones, como las AHLs faltantes, quizás fueron enmascaradas (Eberhard, 2007, comunicación personal). La alta cantidad de molécula de 4C en los extractos, observado en TLC, sería otra causa por la cual no permitiera la observación de las otras moléculas. Además se ha comprobado que la TLC es aproximadamente 100 veces más sensible que GM/MS, ya que mientras los biosensores detectan la intensidad de los diferentes moléculas, a manera de color, con GM/MS cada molécula causa una sola respuesta (Eberhard, 2007, comunicación personal).

La molécula de 4C-HL anteriormente se había reportado como la molécula señal reguladora de procesos fisiológicos en bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* (Latifi *et al*, 1996; Winston *et al*, 1995), *P. aureofaciens* (Pierson *et al*, 1998), *Serratia liquefaciens* (Eberl *et al*, 1999), *Aeromonas hydrophila* (Swift *et al*, 1999) y *V. anguillarum* (Milton *et al*, 2001). Por su parte, la molécula 6C-HL ha sido reportada en *S. liquefaciens* (Eberl *et al*, 1999), *P. aureofaciens* (Pierson *et al*, 1998), *C. violaceum* (McClellan *et al*, 1997), *Erwinia chrysantemi*, *Rhizobium leguminosarum* (Brelles-Mariño y Bedmar, 2001), *Ralstonia solanacearum* (Pierson *et al*, 1998) y *V. anguillarum* (Milton *et al*, 2001). De igual forma la molécula de 8C-HL, se ha reportado en algunos grupos como *Rhizobium leguminosarum* y *Xanthomonas oryzae* (Cha *et al*, 1998), *R. etli* (Daniels, 2002), *A. tumefaciens* (Zhang *et al*, 1993; Fuqua y Winans, 1994) y *Burkholderia cepacia* (Aguilar *et al*, 2003). Varias bacterias producen solamente un solo tipo de moléculas AHLs detectables (McClellan *et al*, 1997), mientras que otras pueden producir hasta siete diferentes tipos de AHLs detectables en diferentes ensayos (Pearson, *et al*, 1994).

Por lo tanto, la detección de las moléculas AHL en *Vibrio* LR6HC nos permite inferir que estos autoinductores se encuentran regulando algún proceso fisiológico primario o secundario de la célula.

## 8.2. Detección de movilidad swarming

La movilidad swarming ha sido considerada para ser un fenómeno “social” que permite a los grupos de bacterias moverse rápida y coordinadamente a través de superficies sólidas o semisólidas (Daniels *et al*, 2006). Como se ha manejado en el transcurso del presente trabajo, este fenómeno ha sido reportado para diferentes grupos bacterianos, ya sea bacterias Gram negativas como Gram positivas (Harsey, 1998), de manera *in vitro*.

La cepa de *Vibrio* LR6HC, presentó una movilidad swarming en condición semisólida, en 3 diferentes medios de cultivos, no importando la presencia de medios con alta salinidad (medio marino 2216) o medios mínimos (HGB) con glicerol como una única de fuente de carbono. Sin embargo, un factor clave para realizar una migración mas rápida fue la presencia de una fuente de energía, con la adición de los casaminoácidos, como también lo reporta Givskov y colaboradores (1999), en la bacteria *S. liquefaciens*.

Estas observaciones fueron reportadas por Matsushita y colaboradores (2005), donde reportan que los diferentes aspectos que pueden presentar las migraciones swarming en situación *in vitro* pueden obedecer a diferentes factores o condiciones, como por ejemplo el tipo de fuente de carbono en el medio de cultivo, la cantidad de oxígeno presente, una humedad relativa considerada y una determinada concentración de sales presente, etc.

En *Proteus mirabilis*, el patrón de migración que presenta las colonias migrantes, adquieren una forma de ramificación, con avanzadas en forma de dedos que

avanzan hacia diferentes puntos en particular (Fraser y Hughes, 1999). Este mismo patrón es observado en la cepa LR6HC cuando presenta un crecimiento en medio de cultivo óptimo (LB 2% NaCl). La posible acción del extracto de levadura en este medio puede intervenir de una manera especial para que la cepa ocupe los hidrolizados de caseína de la triptona y así realizar esta avanzada (Harshey, 1994).

Una condición no reportada es el que presentó la migración en medio marino 2216 por parte de la cepa LR6HC, en la cual se presentan la formación de septos dentro de la placa petri, que hacen que la avanzada presente apariencia de “estrella”. Una condición algo similar sería la presencia de surcos de producción de lipopolisacáridos, que es reportada por Harshey y Matsuyama, (1998) en *E. coli*, en la cual las células secretan estos compuestos para determinar una especie de delimitación de espacio colonizado, evitando un traslape entre colonias continuas.

En la bacteria *Bacillus subtilis*, Matsushita y colaboradores (2005) realizaron experimentos donde observaron que la formación de la colonia en migración podía ser un ejemplo de los patrones de formación y movimiento en aspectos biológicos, de manera *in situ*.

La morfología que presentan las células en condición de migración, pueden ser de diferentes tipos (Belas *et al*, 1982), no obstante, la presencia de múltiples flagelos laterales y alargamiento de células, es común en la mayoría de las células. Este aspecto se observó también cuando se analizó por microscopía electrónica en la cepa LR6HC, la cual presenta un alargamiento considerable alcanzando un tamaño de 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  y una cantidad de flagelos laterales que rodea esta célula, diferenciándose fuertemente del aspecto de una célula vegetativa. Este tipo de apariencia lo comparte con *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, en los cuales el estado de hiperflagelidad y un aumento de tamaño celular (1.5 a 2  $\mu\text{m}$  como en la cepa LR6HC), está presente (Belas y

Colwell, 1982). En *S. liquefaciens*, Eberl y colaboradores, (1999) coinciden con estas mismas características, sobre el aspecto de la bacteria, llegando a presentarse hasta más de 100 flagelos laterales y un tamaño de la bacteria de 3 μm. En *Aeromonas*, por otra parte, solo se encuentran algunos flagelos dispersos en el contorno de la célula, de los cuales, siguen presentando los flagelos polares del nado, evitando con esto una pérdida de esta condición (Gavin, 2003).

De esta manera, es necesario para estos aspectos el uso de moléculas biosurfactantes que ayuden a que se rompa una determinada tensión superficial. Anteriormente se ha comentado el papel que ejerce la regulación de las AHLs, en la producción de estas moléculas, que pueden ser de naturaleza glicolipídica, lipoproteica, fosfolipídica, etc. (Ron y Rosenberg, 2001). En la cepa LR6HC, se observó la presencia de una sustancia que rompía la tensión superficial de gotas de agua, y se encontró, por medio de un proceso de extracción utilizando etanol, la posible molécula que se comporta como biosurfactante, producido por esa cepa, el cual no pudo ser identificado por HPLC, en la cual nos daría una aproximación acerca de la naturaleza bioquímica de la sustancia, para poder incluirla en alguna categoría como anteriormente se mencionaron.

Las biopelículas tienen una estructura muy compleja, en la que se pueden distinguir canales por los que se intercambian oxígeno y otros sustratos con la fase acuosa. Recientemente se reportó que los biosurfactantes tienen un papel importante en la formación de estos canales (Costerton et al, 1994). En la cepa LR6HC se detectó la presencia de formación de biopelículas adheridas a tubos de borosilacato, las cuales fueron extraídas con etanol y cuantificadas. Este resultado se compara con el reportado por Davey y colaboradores (2003), donde reportan en *P. aeruginosa* células se diferencian para formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que

eventualmente llegan a constituir una película. Además reportan que los ramnolípidos tienen un papel importante en la formación de biopelículas.

En base a lo observado, encontramos que la cepa *Vibrio* LR6HC presenta desplazamiento swarming, en donde la morfología de la bacteria presenta características ya reportadas para esta condición, como lo es el alargamiento de la célula y la producción de flagelos laterales. Además, la extracción de una molécula con características parecidas a un biosurfactante y una formación de biopelículas nos permiten pensar que el desplazamiento swarming puede estar relacionado con la formación de biopelículas.

### **8.3. Anulación de la producción de AHLs**

Un mecanismo que se presenta actualmente de una forma efectiva, y con el mismo efecto de una mutación de genes, es la interferencia de la molécula señal por destrucción o ruptura enzimática del AI, utilizada en la comunicación entre bacterias. El aislamiento de bacterias con la capacidad de degradar estas moléculas y la posterior purificación del gen que codifica esta enzima, ha logrado caracterizar el gen *aiiA*, que en *Bacillus sp* 240B1 codifica una acil homoserina lactonasa (AiiA) (Dong *et al*, 2000,2001). La lactonasa es un tipo de metalohidrolasa, que conserva residuos de histidina y aspartato en dos diferentes motivos de su secuencia y son característicos de enzimas asociadas a azufre. Estos residuos que son altamente conservados en la secuencia de aminoácidos, son cruciales para la degradación de las AHL.

La utilización de este gen, dentro de vectores de clonación ha sido una herramienta utilizada actualmente como un método de disminuir los factores de virulencia regulados por la AHLs (Dong *et al*, 2000). En el presente trabajo, se utilizó un plásmido pDSK519 con el gen integro *aiiA* (cedido gentilmente por Y. Zhang,

comunicación personal). La utilización del plásmido pDSK519::*aiiA*, no ha sido hasta al momento reportado. La frecuencia alta de conjugación, arrojó una cantidad considerable de transconjugantes, los cuales presentaban una estabilidad del plásmido hasta 30 generaciones, incluso sin la presencia de antibióticos. En *Burkholderia cepacia*, Whopperer y colaboradores (2006), utilizaron el plásmido homólogo pMLBAD para clonar el mismo gen, encontrando una frecuencia de conjugación alta y una estabilidad de hasta 80 generaciones. Otros vectores de clonación utilizados son pLAFR3 (Dong, *et al*, 2000), pME6000 (Reimmaan *et al*, 2002) y pBHR1 (Ulrich, 2004). Estos trabajos reportan una amplificación (por PCR) del gen *aiiA*, dentro de un amplio rango de hospederos, con un tamaño aproximado de 900 bp. La técnica de PCR, con DNA plasmídico de *Vibrio* LR6HC nos arrojó un tamaño similar, confirmando la presencia de *aiiA*, como lo reporta originalmente Dong y colaboradores (2000).

Así mismo, la transferencia del plásmido pDSK519::*aiiA* dentro cepas *Vibrio* LR6HC produjo una cantidad considerable de cepas que presentaban una reducción drástica de acumulación de AHL, lo cual se comprobó por TLC y GM/SM en la ausencia de las moléculas 4C, 6C y 8C-HL, producidas en la cepa LR6HC+*aiiA*, demostrando la acción degradadora de la lactonasa AiiA por moléculas señal de cadena corta y media. El efecto de esta enzima, reportado por Reimmann y colaboradores (2002) en *P. aeruginosa* PAO1 se observó similarmente una efectiva degradación intercelular de las moléculas señal difusibles 4C-HL y 6-HL, reduciendo la concentración de señal local a un nivel bajo para la detección de la cepa biosensora, demostrando que la lactonasa AiiA presenta un amplio espectro de degradación a diferentes AHLs, ya que sus actividades relativas no varían de manera significativa en AHLs con longitud y sustituciones variables. Dong y colaboradores (2000, 2001), demostraron la expresión de *aiiA* en la bacteria patógena de plantas *Erwinia carotovora*,

reduciendo la acumulación del autoinductor 8C-HL y haciendo que la actividad virulenta de la cepa disminuyera, atenuando la patogenicidad de la cepa.

Aparte, se encontró que las AHL pueden ser metabolizadas por *Variovorax paradoxus*, el cual hidroliza el enlace amida de la molécula señal de oxo-6C-HL y lo utiliza como una fuente de energía y nitrógeno (Leadbetter y Greenberg, 2000). Efectos de homólogos de esta enzima degradadora de AHL se observaron en *P. fluorescens* (Molina *et al*, 2003), *E. coli* (Lee *et al*, 2002) y *Burkholderia thailandensis* (Ulrich, 2004).

Como se comentó anteriormente, la utilización de la lactonasa AiiA para anular la producción intercelular de AHLs, ha sido usada para determinar que genes son regulados por este AI. La regulación de genes de virulencia por la AHL y su relación con la migración swarming, ha permitido que existan reportes donde utilizan la degradación enzimática de AI para evitar la acción patógena de las bacterias (Reimann *et al*, 2002; Ulrich, 2004; Wopperer *et al*, 2006). Esta condición se presenta en la cepa LR6HC+*aiiA*, en la cual la anulación intercelular de las AHLs no permite que las células presenten desplazamiento swarming, a pesar de que las condiciones nutricionales y de superficies sean óptimas para la migración. Reportes en *B. cepacia* (Wopperer *et al*, 2006), *B. thailandensis* (Ulrich, 2004) y *P. aureoginosa* (Reimann *et al*, 2002), coinciden con este resultado, al relacionar la anulación de AHLs con la falta de desplazamiento swarming. Sin embargo, en los anteriores reportes, no se menciona la morfología que presentan las bacterias no migratorias, o si existe una diferencia en tamaño o número de flagelos por presentar esta anulación. En el caso de LR6HC, se observa tanto en SEM como en TEM las diferencias entre la morfología de la cepa silvestre y la cepa no migrante, en el tamaño de la célula y la presencia de flagelos.

Se buscó una relación entre el desplazamiento swarming y la producción de sustancias que actúen como biosurfactantes, en las cepas no migrantes LR6HC+*aiiA*, realizando una prueba de detección y cuantificación de biosurfactante. Se encontró que la cepa no migrante no presentaba producción de alguna sustancia que actuara como biosurfactante, osea que rompiera la tensión superficial, presentando diferencias con respecto a la cepa silvestre. Esta condición fue reportada por Wopperer y colaboradores (2006) en *B. cepacia* donde se vio reducida en su totalidad la presencia de biosurfactante, en cepas no migrantes, sugiriendo que la falta de este agente tenso activo, era la razón de la falta de desplazamiento de la bacteria. Reimann y colaboradores (2002), reporta la incapacidad de producción de ramnolípidos, a causa de la degradación de AHLs, y la falta de desplazamiento swarming. Este autor también reporta una disminución en la producción de biopelículas, bajo las mismas condiciones, comentando que los ramnolípidos tienen una participación clave en las etapas iniciales de formación de estas estructuras de protección y defensa en contra de hospederos. Se encontró una disminución en la capacidad de producción de biopelículas en cepas no migrantes de LR6HC, llegando a observarse una disminución de hasta el 80 %, entre cepa silvestre y modificada, coincidiendo estos resultados con los reportados anteriormente en *P. aureoginosa*.

La utilización de métodos, como la anulación de AHL de forma intercelular en la cepa de *Vibrio* LR6HC, es una herramienta útil para determinar la relación que presenta el autoinductor con la movilidad swarming, al no presentarse un estado migratorio en condiciones óptimas de nutrición y superficie, además, de no presentar cambios morfológicos de típicos de una colonia swarmer y una disminución tanto en la producción de una sustancia que funciona como agente tenso activo, como en la producción de biopelículas.

## IX. CONCLUSIONES

- La cepa de *Vibrio* LR6HC, produce 3 diferentes moléculas señal, como son N-butanoyl, N-hexanoyl y N- octanoyl homoserina lactona, las cuales fueron detectadas utilizando la técnica de TLC.
- Además, se comprobó la presencia de la molécula N-butanoyl homoserina lactona por medio de espectrometría de masas, sin descartar la posibilidad de la presencia de hexanoyl y N- octanoyl homoserina lactona en los extractos.
- La cepa silvestre LR6HC presentó desplazamiento swarming, en condiciones nutricionales y en superficies óptimas. Además, las observaciones por microscopía electrónica de las células swarmers mostraron una transformación morfológica marcada en comparación con las células vegetativas, al presentarse un aumento del tamaño de la célula, la presencia de múltiples flagelos laterales y detección tanto de sustancias que actúan como factores tenso-activos y biopelículas.
- La cepa silvestre LR6HC, presenta producción de una sustancia con características de biosurfactante, utilizada para romper la tensión superficial y facilitar el desplazamiento en condición *in vitro*.
- La introducción del plásmido pDSK519*aiiA* en la cepa de *Vibrio* LR6HC, presentó una alta frecuencia de conjugación por lo que la presencia de este gen *aiiA* fue una buena opción para anular el efecto de autoinductores.

- La alteración de la cepa silvestre con la lactonasa AiiA resultó ser una herramienta eficiente para anular la producción de las moléculas señal AHLs, de una manera intercelular.
- La anulación de la producción de AHLs producidas por la cepa de *Vibrio* LR6HC, demuestran la participación de los autoinductores en la regulación de la movilidad swarming, al no presentarse un estado de migración en condición semisólida y la falta de producción tanto de biopelículas, como de una sustancia que actúe como un biosurfactante, en la ruptura de la tensión superficial.

## X. LITERATURA CITADA

- Aguilar, C., I. Bertani, and V. Venturi. 2003. Quorum-sensing system and stationary-phase sigma factor (*rpoS*) of the onion pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar I type strain, ATCC 25416. **Appl. Environ. Microbiol.** 69:1739-1747
- Alberti, L, Harshey, R.M. 1990. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. **J. Bacteriol.** 172, 4322–4328.
- Allison C, Hughes C. 1991. Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behaviour. **Sci Prog.**;75(298 Pt 3-4):403–422.
- Allison C, Lai HC, Hughes C. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. **Mol Microbiol.** Jun;6(12):1583–1591.
- Alongi, D.M. 1988. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology** 15:59-79.
- Bashan, Y., Moreno, M., and Troyo, E. 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. **Biol. Fertil. Soils** 32, 265-272
- Bashan, Y., and Holguin, G. 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees: Structure and Function** 16: 159-166.
- Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol.** 2, 582–587.

- Bauer, W.D, Teplitski, M. 2001. Can plants manipulate bacterial quorum sensing?. **Aust. J. Plant Physiol.** 28, 913–921.
- Bauer, W.D, Robinson, J.B. 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. **Curr. Opin. Biotechnol.** 13, 234–237.
- Belas, M.R, Colwell, R.R. 1982. Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Bacteriol.** 150, 956–959.
- Brelles-Mariño G. y E.J. Bedmar. 2001. Detection, purification and characterization of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. **Journal of Biotechnology**, 91: 197-209.
- Brencic A. and S. C. Winans. 2005. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 69, 155-194
- Cha, Ch., P. Gao, Y-Ch. Chen, P. D. Shaw y S. K. Farrand. 1998. Production of Acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative Plant-associated bacteria. **MPMI.** 11(11): 1119-1129.
- Cosby, W.M, Vollenbroich, D, Lee, O.H, Zuber, P. 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. **J. Bacteriol.** 180, 1438–1445.
- Costerton, J.W.,1994 Isolation of Pollutants Using a Biobarrier Technology, Twentieth **Annual RREL Research** Symposium Abstract Proceedings, EPA, Washington DC

- Daniels, R. 2002. The role and regulation of *Rhizobium etli cin* quorum sensing locus during free-living growth and symbiotic interaction with the common bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). **Dissertation**, K.U.Leuven
- Daniels, R, De Vos, D.E, Desair, J, Raedschelders, G, Luyten, E, Rosemeyer, V, Verreth, C, Schoeters, E, Vanderleyden, J, Michiels, J. 2002. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. **J. Biol. Chem.** 277, 462–468.
- Daniels, R, Vanderleyen, J, Michiels, J. 2006. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology reviews.** 28, 261-289.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., O'Toole, G. A. 2003. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J. Bacteriol.** 185: 1027-1036
- Deziel, E, Lepine, F, Milot, S, Villemur, R. 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology** 149, 2005–2013.
- Dong, Y.H, Xu, J.L, Li, X.Z, Zhang, L.H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97, 3526–3531.
- Dong, Y.H, Wang, L.H, Xu, J.L, Zhang, H.B, Zhang, X.F, Zhang, L.H. 2001. Quenching quorum sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. **Nature** 411, 813–817.

- Dong, Y.H, Gusti, A.R, Zhang, Q, Xu, J.L, Zhang, L.H. 2002. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.** 68, 1754–1759.
- Dunlap, P.V., K. Kita-Tsukamoto, J. Waterbury and S.M. Callahan. 1995. Isolation and characterization of a visibly luminous variant of *Vibrio fischeri* strain ES114 from the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. **Arch. Microbiol.** 164:194-202.
- Eberhard, A. & Schineller, J. B. 2000. Chemical Synthesis of Bacterial Autoinducers and Autoinducer Analogs. **Methods in Enzymology** 305, 301-315
- Eberl, L, Christiansen, G, Molin, S, Givskov, M. 1996. Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. **J. Bacteriol.** 178, 554–559.
- Eberl, L, Molin, S, Givskov, M. 1999. Surface motility of *serratia liquefaciens* MG1. **J. Bacteriol.** 181, 1703–1712.
- Elasri, M., S. Delorme, P. Lemanceau, G. Stewart, B. Laue, E. Glickmann, P.M. Oger, & Y. Dessaux. 2001. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated than soil-borne *Pseudomonas* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 67:1198-1209.
- Engebrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. 1983. Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. **Cell** 32: 773-781

- Enos-Berlage, J. L., and L. L. McCarter. 2000. Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Bacteriol.** 182:5513-5520
- Flores-Mireles, A.L. 2005. Bacterias diazotroficas y desnitrificantes asociadas a raíces del mangle negro: caracterización de las comunidades a nivel molecular y su producción de moléculas señal tipo acilo homoserina lactona. **Tesis de Maestría**. CIBNOR. Mexico. 132pp.
- Fraser, G.M, Hughes, C. 1999. Swarming motility. **Curr. Opin. Microbiol.** 2, 630–635.
- Fuqua, W.C. and S.C. Winans. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **J. Bacteriol.** 176:2796-2806.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional activators. **J. Bacteriol.** 176:269-275.
- Fuqua, C, Parsek, M.R, Greenberg, E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annu. Rev. Genet.** 35, 439–468.
- Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annu Rev Genet.** 35: 439–468
- Gavin, R.M. 2003. Caracterización genética y fenotípica del flagelo de *Aeromonas*. **Tesis de Doctorado**. Universidad de Barcelona. España 188 pp

- Givskov, M, Eberl, L, Christiansen, G, Benedik, M.J, Molin, S. 1995. Induction of phospholipase- and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. **Mol. Microbiol.** 15, 445–454
- Givskov, M, De Nys, R, Manefield, M, Gram, L, Maximilien, R, Eberl, L, Molin, S, Steinberg, P.D, Kjelleberg, S. 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. **J. Bacteriol.** 178, 6618–6622.
- Givskov, M., Östling, J., Eberl, L., Lindum, P. W., Christensen, A. B., Christiansen, G., Molin, S., Kjelleberg, S. 1998. Two Separate Regulatory Systems Participate in Control of Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. **J. Bacteriol.** 180: 742-745
- Greenberg, E. P. 2003. Bacterial communication: tiny teamwork. **Nature** 424:134.
- Handelsman, J and EV Stabb. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens, **Plant Cell.** 8, 1855-1869,
- Harshey, R.M. 1994. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.** 13, 389–394.
- Harshey, R.M, 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.
- R. M. Harshey. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal.. **Ann. Rev. Microbiol.** 57: 249-273.

- Hazelbauer GL, Berg HC, Matsumura P. 1993. Bacterial motility and signal transduction. **Cell**. Apr 9;73(1):15–22.
- Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriol. Rev.** 36, 478–503.
- Hentzer, M, Wu, H, Andersen, J.B, Riedel, K, Rasmussen, T.B, Bagge, N, Kumar, N, Schembri, M.A, Song, Z, Kristoffersen, P, Manefield, M, Costerton, J.W, Molin, S, Eberl, L, Steinberg, P, Kjelleberg, S, Hoiby, N, Givskov, M. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO J.** 22, 3803–3815.
- Hentzer, M, Riedel, K, Rasmussen, T.B, Heydorn, A, Andersen, J.B, Parsek, M.R, Rice, S.A, Eberl, L, Molin, S, Hoiby, N, Kjelleberg, S, Givskov, M. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology** 148, 87–102.
- Hildebrand, P. D. 1989. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. **Can. J. Plant Pathol.** 11, 205-224
- Holden, M.T, Ram-Chhabra, S, De Nys, R, Stead, P, Bainton, N.J, Hill, P.J, Manefield, M, Kumar, N, Labatte, M, England, D, Rice, S, Givskov, M, Salmond, G.P, Stewart, G.S, Bycroft, B.W, Kjelleberg, S, Williams, P. 1999. Quorum sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.** 33, 1254–1266.

- Holguin, G., M. A. Guzman, Y. Bashan. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in Vitro with rhizosphere *Staphylococcus sp.* **FEMS Microbiol Ecol.** 101: 207-216.
- Holguin, G. y Y. Bashan. 1996. Nitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with by the mangrove rhizosphere bacterium *Staphylococcus sp.* **Soil Biol. Biochem.** 28:1651-1660
- Holguin, G., Y. Bashan, R. A. Mendoza, E. Amador, G. Toledo, P. Vázquez y A. Amador. 1999. La microbiología de los manglares. **Ciencia y Desarrollo.** Sep-Conacyt. Vol. XXV. N. 144. 26-35.
- Holguin, G. P. Vazquez y Y. Bashan. 2001. The role of sediments microorganisms in the productivity, conservation y rehabilitation of the mangroves ecosystems: an overview. **Biol. Biol Fertil Soil.** 33: 265-278.
- Huber, B, Riedel, K, Hentzer, M, Heydorn, A, Gotschlich, A, Givskov, M, Molin, S, Eberl, L. 2001. The *cep* quorum sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology** 147, 2517–2528.
- Jessica O.R., Alberti, L. & Harshey, R. M. 1992. Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar functions. **J Bacterial.** 174, 6125-6137
- Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nat Rev Microbiol.** 2006 Apr;4(4):249-58. Review.

- Kinscherf, T.G, Willis, D.K. 1999. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. **J. Bacteriol.** 181, 4133–4136.
- Latifi, A, Foglino, M, Tanaka, K, Williams, P, Lazdunski, A. 1996. A hierarchical quorum sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. **Mol. Microbiol.** 21, 1137–1146.
- Laycock, M. V., P. D. Hildebrand, P. Thibault, J. A. Walter, and J.-L. C. Wright. 1991. Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas fluorescens*. **J. Agric. Food Chem.** 39:483-489.
- Leadbetter, J.R, Greenberg, E.P. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by *Variovorax paradoxus*. **J. Bacteriol.** 182, 6921–6926.
- Lee, S.J, Park, S.Y, Lee, J.J, Yum, D.Y, Koo, B.T, Lee, J.K. 2002. Genes encoding the *N*-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 68, 3919–3924.
- Lin, Y.H, Xu, J.L, Hu, J, Wang, L.H, Ong, S.L, Leadbetter, J.R, Zhang, L.H. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. **Mol. Microbiol.** 47, 849–860.
- Lindum, P.W, Anthoni, U, Christophersen, C, Eberl, L, Molin, S, Givskov, M. 1998. *N*-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an

- extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. **J. Bacteriol.** 180, 6384–6388.
- Loh, J, Pierson, E.A L.S Pierson III Stacey, G, Chatterjee, A. 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. **Curr. Opin. Plant. Biol.** 5, 285–290.
- Lominski I, Lendrum A C. 1947.The mechanism of swarming *Proteus*. **J Pathol Bacteriol.**;59:688–691.
- Manefield, M, De Nys, R, Kumar, N, Read, R, Givskov, M, Steinberg, P, Kjelleberg, S. 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. **Microbiology** 145, 283–291.
- Mathesius, U, Mulders, S, Gao, M, Teplitski, M, Caetano-Anolles, G, Rolfe, B.G, Bauer, W.D. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum sensing signals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100, 1444–1449.
- Matsushita, M. 1997. Formation of colony patterns by a bacterial cell population, p. 367-393. *In* J. S. Shapiro and M. Dworkin (ed.), **Bacteria as multicellular organisms**. Oxford University Press, New York, N.Y.
- Mazzola M, Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Pierson LS. 1992. 3rd. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. **Appl Environ Microbiol.** Aug;58(8):2616–2624
- McCarter L, Silverman M. 1990. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. **Mol Microbiol.** ;4:1057–1062

- McLean, R.J, Whiteley, M, Stickler, D.J, Fuqua, W.C. 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. **FEMS Microbiol. Lett.** 154, 259–263.
- Miller, B. M. y Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 55:165-199
- Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Cámara, M., Williams, P. 2001. The LuxM Homologue VanM from *Vibrio anguillarum* Directs the Synthesis of N-(3-Hydroxyhexanoyl)homoserine Lactone and N-Hexanoylhomoserine Lactone. **J. Bacteriol.** 183: 3537-3547
- Milton, D.L. 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. **International Journal o Medical Microbiology.** 296, 61-71.
- Molina, L, Constantinescu, F, Michel, L, Reimann, C, Duffy, B, Defago, G. 2003. Degradation of pathogen quorum sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. **FEMS Microbiol. Ecol.** 45, 71–81.
- Odum, W. E. y E. J. Helad. 1975. The detritus based food web o fan estuarine mangroves community. En: **Coupling of land and water systems.** Hasler, A. D. (ed.) Ecological Studies 10. Springer Verlag. New York. 129-136.
- Parsek, M.R, Greenberg, E.P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97, 8789–8793.
- Pearson, J.P, Gray, K.M, Passador, L, Tucker, K.D, Eberhard, A, Iglewski, B.H, Greenberg, E.P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of

- Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91, 197–201.
- Pearson, J. P., C. Van Delden, and B. H. Iglewski. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **J. Bacteriol.** 181:1203-1210.
- Pierson, L.S., Wood, D.W. and von Bodman, S.B. 1999. Quorum sensing in plant-associated bacteria. In: **Cell–Cell Signaling in Bacteria** (Dunny, G.M. and Winans, S.C., Eds.), pp. 101–115
- Prasad, C. 1995. Bioactive cyclic dipeptides. **Peptides** 16, 151–164.
- Rasmussen, T.B, Manefield, M, Andersen, J.B, Eberl, L, Anthoni, U, Christophersen, C, Steinberg, P, Kjelleberg, S, Givskov, M. 2000. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. **Microbiology** 146, 3237–3244.
- Reading NC, Sperandio V. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiol Lett.** Jan; 254(1):1-11
- Redfield, R.J. 2002 Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?. **Trends Microbiol.** 10, 365–370.
- Reimann, C, Ginet, N, Michel, L, Keel, C, Michaux, P, Krishnapillai, V, Zala, M, Heurlier, K, Triandafillu, K, Harms, H, Defago, G, Haas, D. 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology** 148, 923–932.

- Rodelas, B., Lithgow, J.K., Wisniewski-Dyé, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P. y Downie, J.A. 1999. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **J. Bacteriol.** 181, p. 3815 -3823
- Rojas A, Holguin G, Glick BR, Bashan Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N<sub>2</sub>-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. **FEMS Microbiol Ecol** 35: 181-187
- Ron, E.Z, Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. **Environ. Microbiol.** 3, 229–236.
- Sengupta, A. y S. Chaudhuri. 1991. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. **Oecologia** 87:560-564
- Sharma, M, Anand, S.K. 2002. Swarming: a coordinated bacterial activity. **Indian J. Med. Sci.** 83, 707–715.
- Shaw, P.D, Ping, G, Daly, S.L, Cha, C, Cronan, J.E, Rinehart, K.L, Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94, 6036–6041
- Shiner, E.K., S. Reddy, C. Timmons, G. Li, S.C. Williams, and K.P. Rumbaugh. 2004. Construction of a bacterial autoinducer detection system in mammalian cells. **Biol Proced Online.** 6:268-276.
- Smith, D. G. 1972. The *Proteus* swarming phenomenon. **Sci. Prog.** 60:487-506

- Sokolski, W. T., and E. M. Stapert. 1963. Medium for the control of bacterial swarmers. **J. Bacteriol.** 85:718
- Soto, M.J, Fernandez-Pascual, M, Sanjuan, J, Olivares, J. 2002. A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. **Mol. Microbiol.** 43, 371–382
- Swift S, Throup JP, Williams P, Salmond GP, Stewart GS. 1996. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. **Trends Biochem Sci.** Jun;21(6):214–219
- Swift, S., Williams, P. and Stewart, G.S.A.B. 1999. *N*-acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. In: **Cell–Cell Signaling in Bacteria** (Dunny, G.M. and Winans, S.C., Eds.), pp. 291–313
- Teplitski, M, Robinson, J.B, Bauer, W.D. 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Mol. Plant Microbe Interact.** 13, 637–648.
- Throup, J., Bainton, N. J., Briggs, G., Winson, M. K., Bycroft, B.W., Williams, P. & Stewart, G. S. A. B. 1995a. YenI: a LuxI homologue from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of the quorum sensor signal *N*-(3-oxohexanoyl) homoserine lactone. **Mol Microbiol.** 17, 345±356.
- Toledo, G., Y. Bashan y A. Soeldner. 1995. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. **Can. J. Microbiol.** 41: 999-1011.

- Tomlinson, P.B. 1986. **The Botany of Mangroves**. Cambridge University Press, London, 413 pp.
- Ulrich, R. L. 2004. Quorum Quenching: Enzymatic Disruption of N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Bacterial Communication in *Burkholderia thailandensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 6173-6180
- Uroz, S, D'Angelo-Picard, C, Carlier, A, Elasri, M, Sicot, C, Petit, A, Oger, P, Faure, D, Dessaux, Y. 2003. Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. **Microbiology** 149, 1981–1989.
- Uroz, S. R. Chhabra, M. Camara, P. Williams, P. Oger, and Y. Dessaux. 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
- Vazquez, P.,G. Holguin, M.E. Puente, A. Lopez-Cortes y Y. Bashan. 2000. Phosphate-solubilizing microorganism associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Bio Fertil soils.** 30;460-468.
- Visick, K. L., M. J. McFall-Ngai. 2000. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. **J. Bacteriol.**, 182(7), 1779-1787.
- Von Bodman, S. B., J. K. Ball, M. A. Faini, C. M. Herrera, T. D. Minogue, M. L. Urbanowski, A. M. Stevens. 2003. The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpR (Ecc), homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. **J. Bacteriol.** 185:7001-7.

- Wagner, V.E, Bushnell, D, Passador, L, Brooks, A.I, Iglewski, B.H. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulons: effects of growth phase and environment. **J. Bacteriol.** 185, 2080–2095.
- Whitehead, N.A, Barnard, A.M, Slater, H, Simpson, N.J, Salmond, G.P. 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 25, 365–404.
- Whopperer, J, S.T. Cardona, B. Huber, C.A. Jacobi, M.A. Valvano, Eberl, L. 2006. A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum sensing regulated functions within the Burkholderia cepacia complex. **Applied and Environmental Microbiology.** 72: 1579-1587.
- Williams FD, Schwarzhoff RH. 1978. Nature of the swarming phenomenon in Proteus. **Annu Rev Microbiol.** ;32:101–122
- Winson, M.K, Camara, M, Latifi, A, Foglino, M, Chhabra, S.R, Daykin, M, Bally, M, Chapon, V, Salmond, G.P, Bycroft, B.W. 1995. Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92, 9427–9431.
- Young, G. M., M. J. Smith, S. A. Minnich, and V. L. Miller. 1999. The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility and swarming motility. **J. Bacteriol.** 181:2823-2833

- Zhang, L.-H., P. J. Murphy, A. Kerr, and M. E. Tate. 1993. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by *N*-acyl-L-homoserine lactones. **Nature** 362:446-447
- Zhang, R.G, Pappas, T, Brace, J.L, Miller, P.C, Oulmassov, T, Molyneaux, J.M, Anderson, J.C, Bashkin, J.K, Winans, S.C, Joachimiak, A. 2002 Structure of a bacterial quorum sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. **Nature** 417, 971–974.
- Zhang, L.H. and Y.H. Dong. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. **Mol. Microbiol.** 53: 1563-71,
- Zhu, Y., Nam, J., Carpita, N. C., Matthyse, A. G., Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-Mediated Root Transformation Is Inhibited by Mutation of an *Arabidopsis* Cellulose Synthase-Like Gene. **Plant Physiol.** 133: 1000-1010