



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio del fenómeno de *Quorum Sensing* en
aislamientos bacterianos marinos
identificados como *Stappia indica*.**

Laura Cristina Ripe Jaime

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Bioquímica

Bogotá, Colombia

2019

**Estudio del fenómeno de *Quorum Sensing* en
aislamientos bacterianos marinos identificados como
Stappia indica.**

Laura Cristina Ripe Jaime

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora:

Dr. Rer. Nat. Catalina Arévalo-Ferro
Profesora, Departamento de Biología

Codirectora:

Dr. Rer. Nat. Claudia Consuelo Rubiano Castellanos
Profesora, Departamento de Química

Línea de Investigación: Ecología microbiana y *Quorum Sensing*
Grupo de Investigación: Comunicación y Comunidades Bacterianas,
Departamento de Biología.

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Bogotá, Colombia.

2019

Resumen

El *Quorum Sensing* (QS) es un fenómeno de comunicación bacteriana dependiente de la densidad poblacional, en el cual las bacterias utilizan moléculas de señalización para comunicarse y regular la expresión génica de distintos fenotipos a nivel de grupo. Algunos de los fenotipos regulados por este mecanismo de comunicación incluyen la bioluminiscencia, la producción de pigmentos, la movilidad y la fijación de nitrógeno, entre otros. Las moléculas de señalización del QS más ampliamente distribuidas en la naturaleza y, por ende, las más estudiadas son las Acil-Homoserín Lactonas (AHLs), sintetizadas y detectadas por proteínas de las familias LuxI/LuxR, respectivamente, que están presentes principalmente en bacterias Gram negativas.

En un estudio previo del grupo de investigación Comunicación y Comunidades Bacterianas se obtuvieron once aislamientos bacterianos identificados como *Stappia indica* a partir de corales sanos y con enfermedad de Banda Negra del Caribe colombiano. En ensayos preliminares se observó que algunas cepas de esta bacteria podían estar involucradas en eventos de comunicación bacteriana regulados por QS (cuatro de los corales enfermos y una de un coral sano). Este fenómeno no había sido reportado en esta especie bacteriana, razón por la cual en este trabajo se propuso su evaluación desde aproximaciones experimentales y computacionales. Experimentalmente, por medio de técnicas microbiológicas y técnicas de análisis químico se detectaron, extrajeron y analizaron cualitativamente las moléculas de señalización tipo AHLs producidas por diferentes cepas de *S. indica* y, a través de un análisis computacional, se identificaron secuencias de proteínas de los sistemas de QS tipo LuxI/LuxR en este microorganismo. Este trabajo representa el primer reporte de la producción de moléculas de señalización de *Quorum Sensing* Acil-Homoserín lactonas por

parte de *Stappia indica*, así como la identificación de sus respectivas proteínas reguladoras.

Palabras clave: Acil Homoserín Lactonas, Comunicación Bacteriana, Comunidades Bacterianas, *Quorum Sensing*, *Stappia indica*, Acil-Homoserín Lactona-sintasa.

Abstract

Quorum Sensing is a phenomenon of bacterial communication dependent on the density of the cell population, in which bacteria use signalling molecules to communicate and regulate the gene expression of different phenotypes at the group level. Some of the phenotypes regulated by this communication mechanism include bioluminescence, pigment production, motility and nitrogen fixation, among others. The QS signalling molecules most widely distributed in nature and, therefore, the most studied are the Acyl-Homoserine Lactones (AHLs), synthesized and detected by the proteins of the LuxI/LuxR families, respectively, which are present mostly in the Gram-negative bacteria.

In a previous study by the research group *Comunicación y Comunidades Bacterianas*, bacterial isolates such as *Stappia indica* were obtained from corals, healthy and with Black Band disease, from the Colombian Caribbean. In the preliminary tests it was found that strains of this bacterium were involved in bacterial communication events regulated by QS (four of the diseased corals and one from a healthy coral). This phenomenon has not been reported in this bacterial species, therefore we proposed here its evaluation with experimental and computational approaches. Experimentally, by microbiological techniques and by chemical analysis AHL-like signal molecules, produced by different strains of *S. indica*, were detected, extracted and analysed qualitatively and, through a computational analysis, protein sequences of QS LuxI/LuxR-like systems were identified in this microorganism. This work represents the first report of the production of the *Quorum Sensing* signalling molecules such as Acyl-Homoserine lactones by *Stappia indica*, as well as the identification of their respective regulatory proteins.

Key words: Acyl-Homoserine Lactones, Bacterial Communication, Bacterial Communities, *Quorum Sensing*, *Stappia indica*, Acyl-homoserine lactone synthase.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme hacer parte del programa de Maestría en Ciencias – Bioquímica y por la financiación de esta tesis a través de la Convocatoria Nacional de Proyectos Para el Fortalecimiento de la Investigación, Creación e Innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018, con el proyecto número **37572** titulado “Fortalecimiento del estudio y conocimiento de la comunicación bacteriana en algunas especies asociadas a la superficie de los corales *Montastrea cavernosa* y *Montastrea faveolata*”.

Al grupo de investigación de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, dirigido por los profesores Leonardo Castellanos y Freddy Ramos, por permitirme realizar la purificación de los extractos en las instalaciones de su laboratorio.

A las profesoras Ivonne Jeannette Nieto y Carolina Chegwin, directoras del grupo de investigación Química de Hongos Macromicetos de Colombia del Departamento de Química, por permitirme el uso de sus equipos para los análisis por cromatografía de gases.

A la doctora Diana Catherine Peña, por su ayuda con la estandarización y aplicación del método de análisis cromatográfico para la identificación de las moléculas de señalización producidas por las cepas bacterianas de estudio, y por su ayuda en la interpretación y análisis de los resultados obtenidos. Más importante, por compartir tan generosamente sus conocimientos conmigo, por sus enseñanzas, su paciencia y dedicación.

A la profesora Jimena Sánchez y al laboratorista Elkin Ruiz, del laboratorio de microbiología del suelo, por permitirme el uso del espacio para el desarrollo de mi investigación. A la bióloga Lorena Miranda, por su ayuda en la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de las bacterias objeto de estudio en este trabajo.

A mis directoras, las profes Catalina y Claudia, mujeres que me han inspirado y de quienes siempre seguiré aprendiendo. Gracias por su paciencia y por la confianza depositada en mí, por sus consejos, muestras de apoyo y ánimos en los momentos difíciles y sobre todo por dejarme ser y ayudarme en la construcción de mi identidad como profesional y como investigadora.

A los amigos del grupo de investigación CCB, Carolina, Ángel(ust) por todo lo que me enseñaron, por su apoyo y su amistad incondicional, y a Dani, por lo anterior y por su ayuda en la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de mis cepas, y también, por su paciencia.

A los queridos amigos que la academia trajo a mi vida, Ángel, Jessica, Ariadna. Gracias por estar ahí y compartir tantos momentos de risas conmigo. A mi querido Mateo, quien fuera mi primer estudiante, terminó siendo mi profesor y mi amigo. A las excelentes profesionales, y que ahora con orgullo puedo llamar amigas, Caro, Yennifer y Auris, gracias por el apoyo en los momentos críticos de aquellos métodos...

A Manuel, quien ha sido mi compañía y apoyo a pesar de la distancia, gracias por alegrarme la vida con tus canciones y por poner mi cabeza a volar con tus matemáticas. A mi compañera en la amistad, la ciencia, el café y la vida: Erika, la persona más generosa que conozco, -te mereces todo lo que sueñas, gracias totales-.

Finalmente, a las personas más importantes de mi mundo, mi familia, a mis papás, Germán y Victoria, y a mis hermanitos Germán y Eduardo, Por sus sacrificios, por su amor incondicional, gracias infinitas por su compañía, por trasnocharse conmigo, por el café en esas noches largas, por hacer de mí la mujer que soy. Esto es para ustedes, los amo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
JUSTIFICACIÓN	14
MARCO TEÓRICO	16
1.1. Acerca del género <i>Stappia</i>	16
1.2. <i>Stappia indica</i>	17
1.3. <i>Quorum Sensing</i>	19
1.3.1. Elementos reguladores del Quorum Sensing vía AHLs en bacterias Gram negativas.	23
1.4. Detección, Obtención y Análisis de AHLs.	28
1.4.1. Ensayos de detección con biosensores bacterianos	28
1.4.2. Extracción de AHLs	33
1.4.3. Análisis cualitativo de AHLs por Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	34
1.4.4. Identificación de las AHLs	35
OBJETIVOS	38
Objetivo General.	38
Objetivos Específicos.	38
METODOLOGÍA	39
1. Cepas de Estudio.	39
2. Caracterización taxonómica de las cepas de estudio	40
2.1. Caracterización morfológica.	40
2.2. Caracterización Bioquímica	40
2.3. Caracterización Molecular	43
2.4. Evaluación de las condiciones de crecimiento óptimo de las cepas de estudio.	44
3. Análisis de las moléculas de señalización AHLs producidas por <i>Stappia indica</i>	45
3.1. Co-cultivos: ensayos de detección de las moléculas de señalización AHLs producidas por <i>Stappia indica</i>	45
3.2. Extracción de las moléculas de señalización AHLs	47
3.3. Purificación de los extractos de AHLs	49
3.4. Análisis de AHLs por Cromatografía en Capa Delgada	49
3.5. Análisis de AHLs por Cromatografía de Gases	50
4. Análisis computacional de los componentes de QS en <i>Stappia indica</i> . .	51
4.1. Búsqueda de proteínas tipo LuxI/LuxR en el genoma de <i>S. indica</i> ...	52
4.2. Alineamiento Múltiple de secuencias	53
4.3. Modelamiento y análisis de la estructura terciaria de las proteínas. .	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
1. Caracterización taxonómica	57
1.1. Caracterización Morfológica y Bioquímica.	57
1.2. Clasificación taxonómica de las cepas.	62
2. Condiciones óptimas de crecimiento de los aislamientos identificados como <i>Stappia indica</i>	65

2.1. Temperatura, salinidad y pH óptimos de crecimiento para cada aislamiento.	66
2.2. Curvas de crecimiento de diferentes cepas identificadas como <i>Stappia indica</i>	69
3. Detección de moléculas de señalización	71
3.1. Caracterización de las moléculas señal de Quorum Sensing tipo AHLs por técnicas cromatográficas	76
4. Búsqueda de los posibles componentes del sistema de <i>Quorum Sensing</i> en <i>Stappia indica</i> mediante herramientas computacionales.....	88
4.1. Búsqueda de la proteína AHL-sintasa tipo <i>LuxI</i> en <i>S. indica</i>	88
4.2. Búsqueda de la(s) estructura(s) de la(s) posible(s) proteína(s) Factor de Regulación Transcripcional tipo <i>LuxR</i> de <i>S. indica</i>	95
CONCLUSIONES	106
PERSPECTIVAS	108
BIBLIOGRAFÍA.....	109
ANEXOS.....	118
Anexo 1. Reporte de genomas en <i>BioProject</i> de NCBI (aclaración).....	118
Anexo 2. Secuencias de proteínas tipo <i>LuxI</i>	119
Anexo 3. Proteínas tipo <i>LuxR</i>	120
Anexo 4. Tiempos de retención obtenidos por CG-FID para cada una de las muestras problema	121

Figura 1. Diferentes moléculas de señalización del <i>Quorum Sensing</i>	21
Figura 2. Mecanismos generales de <i>Quorum Sensing</i>	23
Figura 3. Sustratos y productos de las AHL sintasas.....	26
Figura 4. Modelos de Siembra en ‘T’ y siembra en punto.	46
Figura 5. Clasificación de los aislamientos bacterianos identificados como <i>Stappia indica</i>	63
Figura 6. Condiciones fisicoquímicas de crecimiento óptimo para <i>S. indica</i> CCBhMc-3	68
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>S. indica</i> CCBhMc-3.	70
Figura 8. Detección de la producción de moléculas de señalización tipo AHLs. Ensayo de Siembra en T.....	73
Figura 9. Detección de la producción de moléculas de señalización tipo AHLs. Ensayo Siembra en punto.	75
Figura 10. CCD de los extractos crudos obtenidos de aislamientos de <i>S. indica</i>	78
Figura 11. Análisis por Cromatografía de Gases de las moléculas señal del QS extraídas.	87
Figura 12. Comparación de la secuencia de la posible AHL sintasa de <i>S. indica</i> , con diferentes proteínas de referencia.	92
Figura 13. Predicción de la estructura secundaria de la AHL-sintasa de <i>S. indica</i>	93
Figura 14. Modelamiento de la estructura terciaria de la proteína AHL-sintasa de <i>S. indica</i>	94
Figura 15. Representación de la localización de los posibles genes codificantes para proteínas del sistema de QS en el genoma CCBhMc-3 de <i>Stappia indica</i>	97
Figura 16. Alineamiento múltiple de las proteínas tipo LuxR incluyendo las posibles homólogas de <i>S. indica</i>	98
Figura 17. Circuito de <i>Quorum Sensing</i> propuesto para <i>Stappia indica</i>	104

Tabla 1. Pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización bacteriana.	42
Tabla 2. Diferentes biosensores para Acil Homoserín Lactonas.	48
Tabla 3. Cepas control para los ensayos con biosensores	48
Tabla 4. Patrones de Acil Homoserín Lactonas empleados para el análisis por CG.	50
Tabla 5. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos de estudio.	60
Tabla 6. Matriz de presencia/ausencia procesos metabólicos en las diferentes cepas de <i>Stappia indica</i>	61
Tabla 7. Identificación taxonómica de los once aislamientos asociados con <i>Stappia indica</i>	62
Tabla 8. Condiciones fisicoquímicas evaluadas.....	66
Tabla 9. Resultados bioensayos con el biosensor pSB403.....	77
Tabla 10. Resultados fraccionamiento de los extractos.	81
Tabla 11. Índices de retención de las AHLs producidas por <i>S. indica</i>	85
Tabla 12. Proteínas candidatas a Factores de Regulación Transcripcional tipo LuxR de <i>S. indica</i>	97
Tabla 13. Estructuras de las posibles proteínas tipo LuxR de <i>S. indica</i>	101

Ecuación 1 $Ic = N + FG + Mei$ 36

Ecuación 2 $IR = 100 \times \text{tr}x - \text{tr}(n - 1)\text{tr}(n + 1) - \text{tr}(n - 1) + nC(n - 1)$ 37

Abreviaturas y Siglas	
117	<i>Pseudomonas putida</i> IsoF 117
ACP	Proteína cargadora de acilo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AHLs	Acil Homoserín Lactonas
CAP	<i>Contig Assembly Program</i>
CCB	Grupo de Investigación de Comunicación y Comunidades Bacterianas
CCBBBdMc	Comunicación y Comunidades Bacterianas- <i>BlackBand diseased-Montastrea cavernosa</i>
CCBBBdOf	Comunicación y Comunidades Bacterianas- <i>BlackBand diseased-Orbicella faveolata</i>
CCBhMc	Comunicación y Comunidades Bacterianas- <i>healthy-Montastrea cavernosa</i>
CCBhOF	Comunicación y Comunidades Bacterianas- <i>healthy-Orbicella faveolata</i>
cLB	caldo Luria Bertani
CoA	Coenzima A
DO	Densidad óptica
FID	Detector de Ionización en Llama
GFP / gfp	<i>Green Fluorescent Protein</i> - Proteína Verde Fluorescente
HTH	Dominio Hélice-Giro-Hélice
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IsoF	<i>Pseudomonas putida</i> IsoF
LB	Medio de cultivo Agar Luria Bertani
LIA	<i>Lysine Iron Agar</i> ; Agar Lisina Hierro
modo SIM	<i>Single Ion Mode Scan</i>
NaCl	Cloruro de sodio
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
Pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QS	<i>Quorum Sensing</i>
rADN	ADN ribosomal
Rf	Relación de frentes
RP	<i>Reverse Phase</i> - Fase Reversa
rpm	Revoluciones Por Minuto
SAM	S-adenosilmetionina
SIM	Medio Sulfuros-Indol-Motilidad
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i> ; Agar hierro tres azúcares de Kligler
u.f.c	Unidades Formadoras de Colonias
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

Las interacciones célula-célula han comenzado a recibir especial atención debido a que regulan la selección y estratificación de consorcios de microorganismos asociados a un hospedero. Estas interacciones en comunidad están reguladas por procesos de comunicación bacterianos como el *Quorum Sensing* (C. Fuqua & Greenberg, 2002; Waters & Bassler, 2005). El *Quorum Sensing* (QS) es un fenómeno de interés universal debido a las implicaciones que tiene sobre la regulación de la expresión de fenotipos bacterianos, en la cual, las bacterias utilizan moléculas de señalización para comunicarse y regular la expresión génica dependiendo de la densidad poblacional (C. Fuqua & Greenberg, 2002; Miller & Bassler, 2001; Waters & Bassler, 2005). La mayoría de las moléculas señal del QS, que se han reportado, son moléculas orgánicas pequeñas o péptidos con una longitud de entre 5 y 20 aminoácidos. Un ejemplo de estas moléculas pequeñas son las Acil Homoserín Lactonas (AHLs), sintetizadas principalmente por bacterias Gram negativas (Steindler & Venturi, 2007).

Algunos de los fenotipos regulados por este mecanismo de comunicación incluyen actividades fisiológicas como la virulencia, motilidad, maduración de *biofilms* y la reducción y fijación de nitratos, entre otras (Mellbye, Spieck, Bottomley, & Sayavedra-Soto, 2017; Miller & Bassler, 2001; Toyofuku et al., 2007). En general, las características reguladas por QS son fundamentales para definir el papel que desempeñan las bacterias en un organismo hospedero y median, además, las relaciones simbióticas que allí se establecen. Entre las asociaciones simbióticas que se dan al interior de un ecosistema, la relación entre el hospedero y las comunidades bacterianas asociadas es quizás la más diversa, abundante y por lo tanto la más compleja (Rosenberg, Koren, Reshef, Efrony, & Zilber-Rosenberg, 2007). Físicamente, el hospedero aporta diferentes hábitats propicios para la colonización y sostenimiento de los microorganismos que alberga (Raina, Tapiolas, Willis, & Bourne, 2009), y los simbiosistas microbianos no solo proveen alimento y metabolizan moléculas necesarias para el hospedero sino que lo protegen de

Introducción

enfermedades mediante la prevención de infecciones oportunistas tanto por competencia física por el espacio, como a través de la producción de agentes antibacterianos o inhibidores del crecimiento de otros microorganismos (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

La producción y detección de moléculas de señalización por parte de algunas bacterias tienen una influencia importante en el funcionamiento de un ecosistema, pues el mantenimiento del equilibrio depende, entre otras cosas, de la composición de especies y las funciones que cumplen dentro de la comunidad bacteriana que se encuentra asociada con determinado organismo en los diferentes escenarios biológicos y esto podría tener un efecto positivo o negativo en la de la homeostasis (C. Fuqua & Greenberg, 2002; Morrow, Moss, Chadwick, & Liles, 2012; Rosenberg et al., 2007).

En un trabajo previo del grupo de investigación Comunicación y Comunidades Bacterianas, la bacteria *Stappia indica* fue aislada e identificada dentro de la comunidad bacteriana presente en corales de las especies *Montastrea cavernosa* y *Orbicella faveolata* del Caribe colombiano sanos y con enfermedad de Banda Negra (Diaz Sana & Ripe Jaime, 2016). *S. indica* fue la única especie bacteriana encontrada en ambos corales y en ambos estados de salud, los aislamientos obtenidos principalmente de los corales enfermos mostraron evidencias de su participación en eventos de comunicación bacteriana mediados por moléculas tipo AHLs. *S. indica* fue aislada por primera vez por Lai y colaboradores en 2010, a partir de un consorcio de microorganismos obtenidos de aguas profundas del Océano Índico, capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Lai et al., 2010). En otros estudios, *S. indica* ha sido aislada e identificada de consorcios de microorganismos capaces de degradar petróleo (W. Wang, Wang, & Shao, 2010), como parte de cultivos reductores del ion perclorato en ambientes salinos (Stepanov et al., 2014), recientemente ha sido clasificada como parte del inventario de comunidades con diversidad filogenética y metabólica en ambientes salinos de los Andes colombianos (C. Cárdenas & Baena, 2015), así como se determinó que se

Introducción

trata de un organismo con una actividad electroquímica mayor que otras bacterias, dada su capacidad de transferir electrones hacia el espacio extracelular (Logan & Regan, 2006; Xiao et al., 2015).

Su ubicuidad y su capacidad de adaptación a diferentes ambientes hacen que sea interesante conocer las características que tiene este microorganismo y cómo puede involucrarse en eventos de comunicación bacteriana, ya que hasta la fecha no se han encontrado registros de esta actividad para esta bacteria. Estudios como este contribuyen con la comprensión de los eventos de comunicación bacteriana mediados por moléculas señal del QS tipo AHLs en *S. indica*.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, en el presente trabajo se propuso el estudio del fenómeno de QS en aislamientos bacterianos identificados como *S. indica* desde aproximaciones experimentales y computacionales. Desde lo experimental, haciendo uso de biosensores bacterianos se detectó un conjunto de moléculas señal AHLs, las cuales fueron extraídas para ser posteriormente, separadas y evaluadas cualitativamente por técnicas cromatográficas. Por medio de herramientas computacionales y con el uso de diferentes estrategias de búsqueda, se identificaron las posibles proteínas homólogas de los sistemas LuxI/LuxR de QS en este microorganismo y se modelaron sus estructuras tomando en consideración un genoma disponible en la base de datos *BioProject* del NCBI obtenido a partir de una de las cepas caracterizadas en este estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron conocer diferentes componentes del circuito de QS de *Stappia indica*, que está conformado por una proteína AHL-sintasa de la familia LuxI, las moléculas de señalización AHLs producidas por las diferentes cepas de *Stappia indica* y dos proteínas que funcionarían como factores de regulación transcripcional de la familia LuxR. Con estos resultados presentamos el primer reporte de eventos de comunicación bacteriana de QS mediado por diferentes Acil Homoserín lactonas en esta bacteria.

JUSTIFICACIÓN

En estudios previos sobre la composición de las comunidades de corales, sanos y con enfermedad de Banda Negra del Caribe colombiano se encontraron varios aislamientos identificados como *Stappia indica*, y se determinó que ésta fue la única especie que se encontraba en las dos comunidades evaluadas. También, de manera preliminar, se observó que algunos aislamientos que fueron asociados con *S. indica*, podrían estar involucrados en eventos de comunicación bacteriana mediados por moléculas de señalización del *Quorum Sensing*.

En la actualidad, no existen reportes de comunicación bacteriana mediada por QS en *S. indica* por lo cual no se conoce cuáles son los fenotipos regulados por este mecanismo en esta bacteria y su influencia en los ambientes de los que ha sido aislada, los reportes del fenómeno de QS en la enfermedad de Banda Negra son pocos, y los estudios disponibles involucran únicamente microorganismos que, en general, son modelo de estudio de QS tales como especies del género *Vibrio* (Bhedi, 2017; J. L. Meyer, Gunasekera, Scott, Paul, & Teplitski, 2016; Zimmer et al., 2014). Además, estos estudios, no hacen referencia a la *otra comunidad heterotrófica*, que se sabe, está involucrada en el desarrollo de la enfermedad; y tampoco se dispone de estudios encaminados a la descripción del fenómeno de QS en especies bacterianas nativas del Caribe colombiano.

Por estas razones, el presente trabajo representa una contribución, no solo a la identificación de componentes del sistema de QS en *S. indica*, también es una contribución a la descripción de este fenómeno en un miembro de la comunidad bacteriana heterótrofa de corales del Caribe colombiano sanos y con enfermedad de Banda Negra.

Corroborar la presencia de las moléculas señal tipo AHLs en aislamientos de comunidades bacterianas permite reconocer características de la participación de esas especies en la comunicación mediada por *Quorum Sensing* dentro de la

Justificación

comunidad. Ya ha sido reportado que la participación del QS es fundamental en el establecimiento de relaciones de cooperación o de competencia en la estructuración de los consorcios bacterianos (Abisado, Benomar, Klaus, Dandekar, & Chandler, 2018). Por esta razón, establecer si hay cambios en la producción de moléculas de señalización en cepas aisladas de comunidades diferentes podría ser un indicador de que estas moléculas posiblemente estén involucradas en la sincronización de la expresión de fenotipos relacionados con la diacronía de las comunidades bacterianas.

Este trabajo busca, obtener una visión más completa del sistema de QS en *S. indica*, para esto se llevó a cabo la caracterización de las moléculas señal AHLs producidas por diferentes cepas por medio de técnicas microbiológicas y técnicas de análisis químico cualitativo, así como el aprovechamiento de la información obtenida a partir del genoma de una de las cepas de estudio, haciendo uso de herramientas computacionales. Para el desarrollo de este trabajo se partió de la hipótesis de que existen regiones génicas en el genoma de estudio que están relacionadas con la expresión de fenotipos regulados por *Quorum Sensing*.

MARCO TEÓRICO

1.1. Acerca del género *Stappia*.

El género *Stappia* fue descrito por primera vez por Uchino y colaboradores (1998), a partir de la reclasificación basada en la secuenciación del gen ribosomal 16S de bacterias aisladas de ambientes marinos, del género *Agrobacterium*. La morfología celular es de bacilos Gram negativos, con un tamaño entre 0,6 a 1,0 μm de ancho y 2 a 4 μm de longitud. Móviles con de un flagelo polar. Crecen aeróbicamente, no muestran crecimiento fotosintético. oxidasa y catalasa positivos. Requieren agua de mar o Na^+ para crecer. La quinona principal es la ubiquinona 10. Los ácidos grasos principales son 18:1, 18:0 y 3-OH 14:0. Las cepas reclasificadas pertenecen a la familia Rhodobacteraceae, del orden de las Rhodobacterales, subgrupo dos de las alfa proteobacterias, la especie tipo es *S. stellulata*. En este estudio también se describieron aislamientos asignados a la nueva especie *S. aggregata* (Uchino, Hirata, Yokota, & Sugiyama, 1998).

Diferentes estudios indican que cepas de *Stappia* han sido aisladas, en general, de ambientes marinos. Es el caso de las especies *S. stellulata*, *S. aggregata* (Uchino et al., 1998), *S. alba*, aislada de la comunidad bacteriana cultivable de ostras de la costa Mediterránea (Pujalte, Carmen Maclán, Arahal, & Garay, 2005), *S. marina*, aislada de una muestra de llanura mareal del mar Amarillo en Corea del Sur (B.-C. Kim, 2006), ***S. indica*** obtenida de un consorcio de microorganismos degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos de sedimentos del océano Índico (Lai et al., 2010), y *S. taiwanensis* se encontró en la comunidad bacteriana de aguas termales costeras de Isla Verde, en Taiwán (Kämpfer et al., 2013).

A la fecha, las cepas de *Stappia* ha sido obtenidas de ambientes heterotróficos; en concordancia, el género ha sido descrito como quimiorganotrofo (Uchino et al., 1998). Diferentes cepas de *Stappia* oxidan CO , pues contienen el gen *coxL* de la forma I que codifica para la subunidad grande de la Monóxido de Carbono (CO) deshidrogenasa aeróbica (CODH) y también el gen putativo *coxL* de la forma II (B.-

C. Kim, 2006). Además, algunas cepas poseen *cbbL*, el gen de la subunidad grande para la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (RuBisCO) y podrían ser capaces de acoplar el uso de CO con la fijación de CO₂ (King & Weber, 2007; King Gary, 2003), lo que sugiere la posibilidad de un metabolismo litotrófico o mixotrófico.

Las cepas de *Stappia* son entonces funcionalmente versátiles, ocupan muchos nichos ecológicos y participan en procesos y ciclos biogeoquímicos que son importantes en microescalas y escalas globales (por ejemplo, la oxidación del CO y la denitrificación). La habilidad de los aislamientos de *Stappia* para utilizar los iones nitrato como últimos aceptores en la cadena de transporte de electrones o denitrificar, usar numerosos sustratos orgánicos y funcionar en salinidades bajas a moderadas facilita la participación en procesos aeróbicos y anaeróbicos en el reciclaje de carbono y nitrógeno en un amplio rango de ambientes marinos (Weber & King, 2007).

1.2. *Stappia indica*.

La cepa B106T fue aislada por primera vez por Lai y colaboradores en 2010, a partir de un consorcio de microorganismos obtenido de aguas profundas del océano Índico, los cuales fueron capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos. En ese trabajo se realizó la caracterización taxonómica de este aislamiento teniendo en cuenta las características morfológicas, bioquímicas y moleculares. Los resultados obtenidos indicaron que la cepa B106T representaba una nueva especie del género *Stappia*, para la cual se propuso el nombre *Stappia indica* sp. nov., siendo B106T la cepa tipo (Lai *et al.*, 2010).

Lai y colaboradores (2010) determinaron que la morfología celular era de bacilos Gram negativos de aproximadamente 1.0 µm ancho y 1.0 µm en longitud, móvil por medio de un flagelo polar. En agar marino 216L forma colonias lisas de color gris-blanco, con bordes regulares, 2-3 mm de diámetro luego de 72 horas de incubación a 28°C, no pigmentadas y moderadamente elevadas en el centro. oxidasa y catalasa

positivas, pero negativa para la producción de indol, hidrólisis de almidón, β -glucosidasa, β -galactosidasa, ureasa y arginina di hidrolasa. Se observó crecimiento a salinidades de 0,5-11% y a temperaturas entre 4 y 42 °C, y la cepa fue capaz de reducir nitratos, pero incapaz de degradar Tween 80 o gelatina. El análisis de la secuencia del gen de ARNr 16S reveló que tenía un porcentaje de similitud de 97.7% con *S. stellulata* IAM 12621T y, finalmente, a través de ensayos de hibridación ADN-ADN se determinó que la cepa B106T y *S. stellulata* IAM 12621T tenían una baja relación ADN-ADN (43%), lo que permitió determinar que se trataba de especies distintas (Lai et al., 2010).

En 2010, se obtuvieron dos aislamientos identificados como *S. indica* en el estudio que evaluaba consorcios de microorganismos degradadores de petróleo crudo presentes en aguas circundantes de la isla de Xiamen. En este estudio se hizo un tamizaje en la búsqueda del gen *alkB* que codifica para la enzima Alcano hidroxilasa (AlkB), que se encuentra ampliamente conservada entre las proteobacterias; aunque no se detectó la presencia de este gen entre los dos aislamientos identificados como *S. indica*, sí se pudo determinar que esta bacteria es capaz de crecer en medios suplementados con *diesel* y con petróleo crudo (W. Wang et al., 2010).

Stepanov y colaboradores (2014), determinaron que bacterias de la familia de las Rhodobacteraceae (grupo taxonómico al que pertenece *S. indica*) son capaces de reducir nitrato y que existe homología entre las enzimas encargadas de esta actividad y aquellas relacionadas con la reducción del ion perclorato. En este estudio se obtuvieron dos aislamientos que mostraron un 99% de similitud de secuencia con *S. indica* B106T como parte de cultivos reductores del ion perclorato en ambientes salinos (Stepanov et al., 2014).

S. indica se encontró como parte del inventario de comunidades con diversidad filogenética y metabólica en ambientes salinos de los Andes colombianos, en el manantial salino de Salado de Consotá en Pereira, Colombia de donde se obtuvieron tres aislamientos. En este estudio se ratificó el carácter halo tolerante de

esta especie y se secuenció y anotó el genoma de la cepa *S. indica* USBA 352 (C. Cárdenas & Baena, 2015).

En 2015 se determinó *Stappia indica* es un organismo con actividad electroquímica. Los microorganismos electroquímicamente activos (EAMs) son un grupo de microorganismos que permiten el flujo de electrones entre las células/celdas y un aceptor/donador de electrones. En este estudio, se obtuvo el OTU 36744 (el más abundante, con abundancia cercana al 20%) en una muestra de un sistema bio-electroquímico de Xiamen (XM1). Los sistemas bio-electroquímicos (BESs) se utilizan en la recuperación de energía y productos, acoplando el tratamiento de aguas residuales con la comunidad microbiana central en *biofilms* electroquímicamente activos. El OTU 36744 fue 99% idéntico a una cepa de *Stappia indica* (número de acceso a GenBank EU72671.1). *S. indica*, que nunca había sido reportada como un EAM, produjo una corriente relativamente baja de 50 microamperios, indicando una capacidad para producir electricidad (Xiao *et al.*, 2015).

1.3. Quorum Sensing.

Las bacterias utilizan señales químicas para comunicarse y regular actividades en función de la densidad poblacional, éste fenómeno se conoce como *Quorum Sensing* (QS) y es una cualidad común en diversas especies bacterianas, “*que podría ser de hecho una característica universal de señalización bacteriana*” (C. Fuqua & Greenberg, 2002). El QS es un proceso de comunicación célula a célula que involucra la producción, detección y respuesta a moléculas de señalización extracelulares que en un principio se denominaron auto inductores (AIs). Las bacterias producen moléculas de señalización basalmente, estas moléculas se movilizan hacia el espacio extracelular, ya sea por difusión pasiva o con la ayuda de transportadores. Cuando la densidad poblacional es baja, las moléculas están presentes en concentraciones por debajo del umbral requerido para iniciar la activación de la expresión génica; pero una vez el cultivo alcanza una densidad

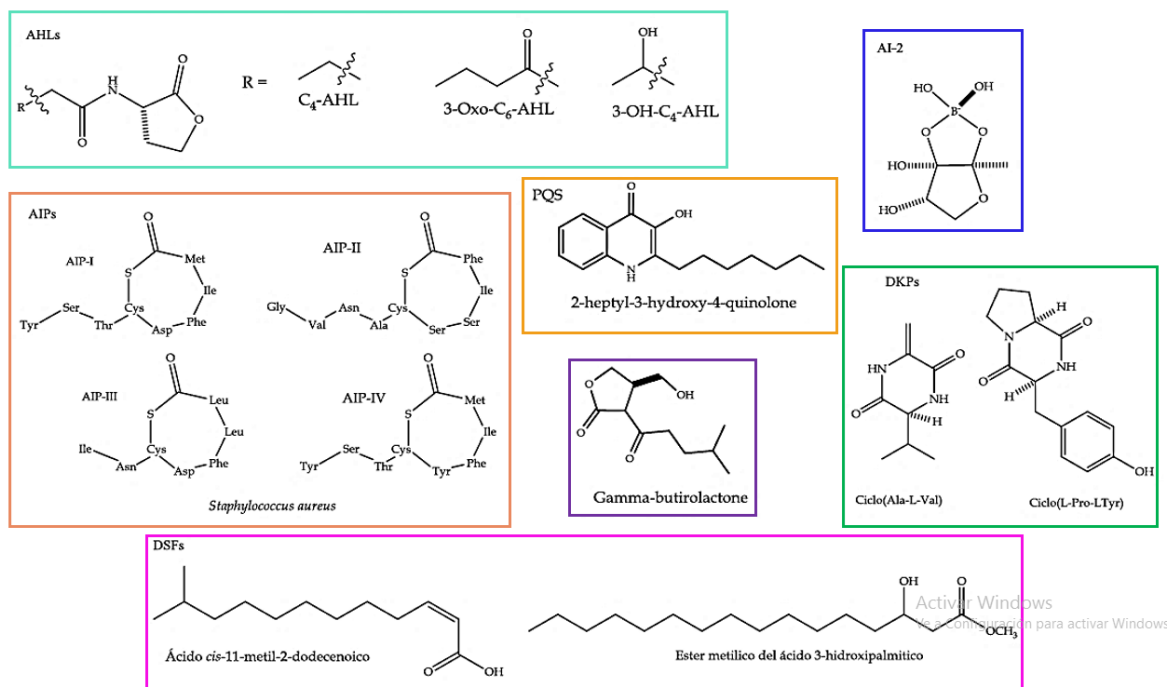
poblacional considerable (Nilsson et al., 2001), los Als a su vez alcanzan la concentración necesaria para unirse de manera estable a la proteína receptora. El complejo molécula señal-receptor activa la expresión de genes necesarios para comportamientos cooperativos, a la vez que regula la producción de nuevas moléculas de señalización (Rutherford & Bassler, 2012). Algunos estudios han reportado que las concentraciones de moléculas de señalización tipo Acil-Homoserín Lactonas necesarias para la iniciar la respuesta en eventos de comunicación bacteriana están en un rango de entre 10 y 50 nM (Andersen et al., 2001; Farrand, Qin, & Oger, 2002; Fekete et al., 2007; Fekete, Kuttler, et al., 2010; Mcclean et al., 1997; Shaw et al., 1997; Whitehead, Barnard, Slater, Simpson, & Salmond, 2001).

El QS controla genes que dirigen actividades que pueden ser benéficas para la comunidad y son expresadas por grupos de bacterias que actúan en sincronía (Nadell, Xavier, Levin, & Foster, 2008; Rutherford & Bassler, 2012). Entre los procesos que son controlados por QS se incluyen la bioluminiscencia, esporulación, competencia, movilidad, producción de antibióticos, formación de *biofilms*, la secreción de factores de virulencia, la producción de bienes públicos y la fijación de nitrógeno (Eberhard et al., 1981; Fan et al., 2011; Mellbye et al., 2017; Mukherjee & Bassler, 2019; Schuster, Joseph Sexton, Diggie, & Peter Greenberg, 2013).

En general, las bacterias Gram negativas utilizan, entre otras moléculas, Acil Homoserín Lactonas (AHLs) como Als, mientras que las bacterias Grampositivas, en su mayoría, necesitan de oligopéptidos procesados para comunicarse. En la actualidad, se sabe que existe que una rica diversidad de moléculas usadas para la comunicación bacteriana. La mayoría de las moléculas de QS son moléculas orgánicas pequeñas o péptidos de entre 5 y 20 aminoácidos (Osorno, Castellanos, Ramos, & Arévalo-Ferro, 2011). Ejemplos de estas moléculas de señalización se resumen en la Figura 1 (página 21), Acil Homoserín Lactonas (AHLs), 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolonas de *Pseudomonas aeruginosa* (PQS), ácidos grasos de cadena larga y metil-ésteres de ácidos grasos, así como el Auto inductor 2 (AI-2), un término

colectivo para un grupo de furanonas interconvertibles derivadas de la dihidroxipentanodiona (DPD). El AI-2 también es producido por algunas bacterias Gram positivas, y también se ha reportado que este tipo de bacterias producen algunas AHLs (Bassler, 2002; Biswa & Doble, 2013), aunque generalmente esos organismos prefieren péptidos lineales, modificados o cíclicos tales como los péptidos auto inductores (AIPs) Factores de señal difusible (DSFs por sus siglas en inglés: *Difusible signal factors*), y Diceto-piperazinas (DKPs). Otros organismos entre los que, por ejemplo, se encuentran los estreptomicetos, sintetizan Gamma-butirolactonas tales como el factor A, las cuales son estructuralmente parecidos a las AHLs (Sidda & Corre, 2012).

Figura 1. Diferentes moléculas de señalización del *Quorum Sensing*.



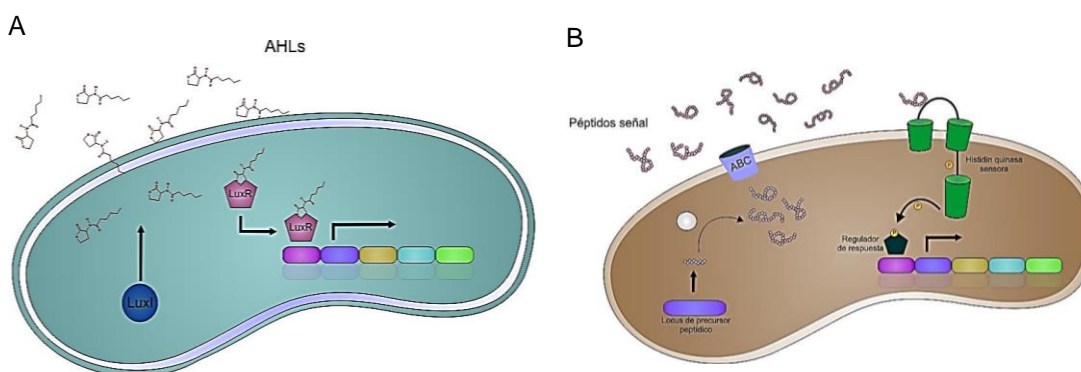
Las Acil-Homoserín Lactonas (**AHLs**) están conformadas por un anillo Lactona, unido mediante un enlace amida a una cadena radical carbonada que puede variar tanto en longitud, como en el grado de saturación así como en el grado de sustitución sobre el Carbono gamma; el Auto inductor 2 (**AI-2**); los péptidos auto inductores (**AIPs**); quinolonas de *Pseudomonas aeruginosa* (**PQS**); **Gamma-butirolactonas**; Factores de señal difusible (**DSFs**); y Dicetopiperazinas (**DKPs**). Tomado de (Osorno et al., 2011).

El primer sistema de comunicación bacteriana mediado por QS que se describió es el que posee *Vibrio fischeri* (Nealson & Hastings, 1979). Cuando la densidad celular es alta, *V. fischeri* activa los genes que se requieren para la bioluminiscencia a través de las proteínas LuxI y LuxR, que a partir de ese momento representan el sistema de QS canónico. LuxI es la enzima que se encarga de sintetizar la molécula señal N-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona (3-oxo-C6 AHL) (Eberhard et al., 1981). 3-oxo-C6 AHL se une de manera específica a la proteína LuxR (Hanzelka & Greenberg, 1996), un factor de transcripción que activa la expresión del operón *luxCDABEG*, el cual contiene los genes que permiten la bioluminiscencia (Engbrecht & Silverman, 1984). Desde entonces, muchos otros sistemas de comunicación bacteriana mediados por QS han sido descritos, principalmente entre las Proteobacterias. Por ejemplo, Fuqua y colaboradores hacen una revisión de las proteínas LuxI/LuxR (W. C. Fuqua, Winans, & Greenberg, 1994), Whiteley y colaboradores identificaron los genes que controlan el QS en *Pseudomonas aeruginosa*, los sistemas *lasI/lasR* y *rhlI/rhIR*, y Arévalo-Ferro y colaboradores identificaron proteínas reguladas por el sistema de QS en esta bacteria (Arevalo-Ferro et al., 2003; Whiteley, Lee, & Greenberg, 1999) (Para una revisión más extensa sobre sistemas de comunicación en bacterias Gram negativas: (Abisado et al., 2018; Lerat & Moran, 2004; Papenfort & Bassler, 2016; Whitehead et al., 2001)).

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas utilizan diferentes sistemas de QS. Las bacterias Gram positivas utilizan péptidos, llamados péptidos auto inductores (AIPs), como moléculas de señalización. Una vez producidos en la célula, los AIPs son procesados y secretados. Cuando la concentración extracelular de AIPs es alta, lo cual ocurre a alta densidad celular, los AIPs son reconocidos por un receptor histidina quinasa unido a membrana, que pertenece a un sistema de dos componentes. La unión de los AIPs activa la actividad quinasa del receptor, este se auto fosforila y transfiere el fosfato a un regulador de respuesta citoplasmático afín. El regulador de respuesta fosforilado activa a su vez, la transcripción de genes en el operón regulador de QS (Rutherford & Bassler, 2012).

Cada vez se encuentran nuevos sistemas de QS que conforman un banco de información de homólogos de LuxR y LuxI, que producen y responden a diferentes tipos de auto inductores, pero difieren en la regulación de los genes blanco (C. Fuqua & Greenberg, 2002). En la Figura 2 (página 23), se encuentra un modelo general para los sistemas de QS en bacterias Gram positivas y Gram negativas (A. Cárdenas, Rodríguez-R, Pizarro, Cadavid, & Arévalo-Ferro, 2012).

Figura 2. Mecanismos generales de *Quorum Sensing*.



- A. Mecanismo general de QS en bacterias Gram negativas mediado por AHLs, y B. Mecanismo general de QS mediado por péptidos señal en bacterias Gram positivas. Tomado de (A. Cárdenas et al., 2012).

1.3.1. Elementos reguladores del Quorum Sensing vía AHLs en bacterias Gram negativas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el mecanismo básico de QS involucra la secreción y percepción de moléculas de señalización entre microorganismos por parte de proteínas tipo LuxI/LuxR. También se ha dicho que las moléculas de señalización del QS más estudiadas son las N-Acyl Homoserine Lactones, las cuales son producidas principalmente por bacterias Gram negativas por medio de proteínas de la familia LuxI (Alagely, Krediet, Ritchie, & Teplitski, 2011; C. Fuqua & Greenberg, 2002; Papenfort & Bassler, 2016).

Las proteínas de la familia LuxI catalizan la formación de las AHLs utilizando como sustratos S-adenosil-metionina (SAM) y un acil-tioéster en la forma de una proteína cargadora de acilo conjugada con el acilo correspondiente (acil-ACP), estos precursores también son empleados en el metabolismo central de ácidos grasos (More et al., 1996). Algunas AHL sintasas utilizan Acil-Coenzima A (Acil-CoA) como sustrato en lugar de Acil-ACP en la Figura 3 A, (página 26), se puede observar la reacción general, en la Figura 3 B se observan las diferencias estructurales entre Acil-ACP y Acil-CoA (Christensen, Brecht, Dudekula, Greenberg, & Nagarajan, 2014). La reacción de transferencia del grupo acilo lleva a la producción de un intermediario Acil-SAM, el cual posteriormente sufre una lactonización para formar la AHL. En la Figura 3 C, se muestra un ejemplo del mecanismo propuesto de síntesis de la 3-Oxo-Hexanoil-homoserín Lactona en el que el donador del grupo acilo es la 3-Oxo-Hexanoil-CoA (Cuadrado Silva, 2009).

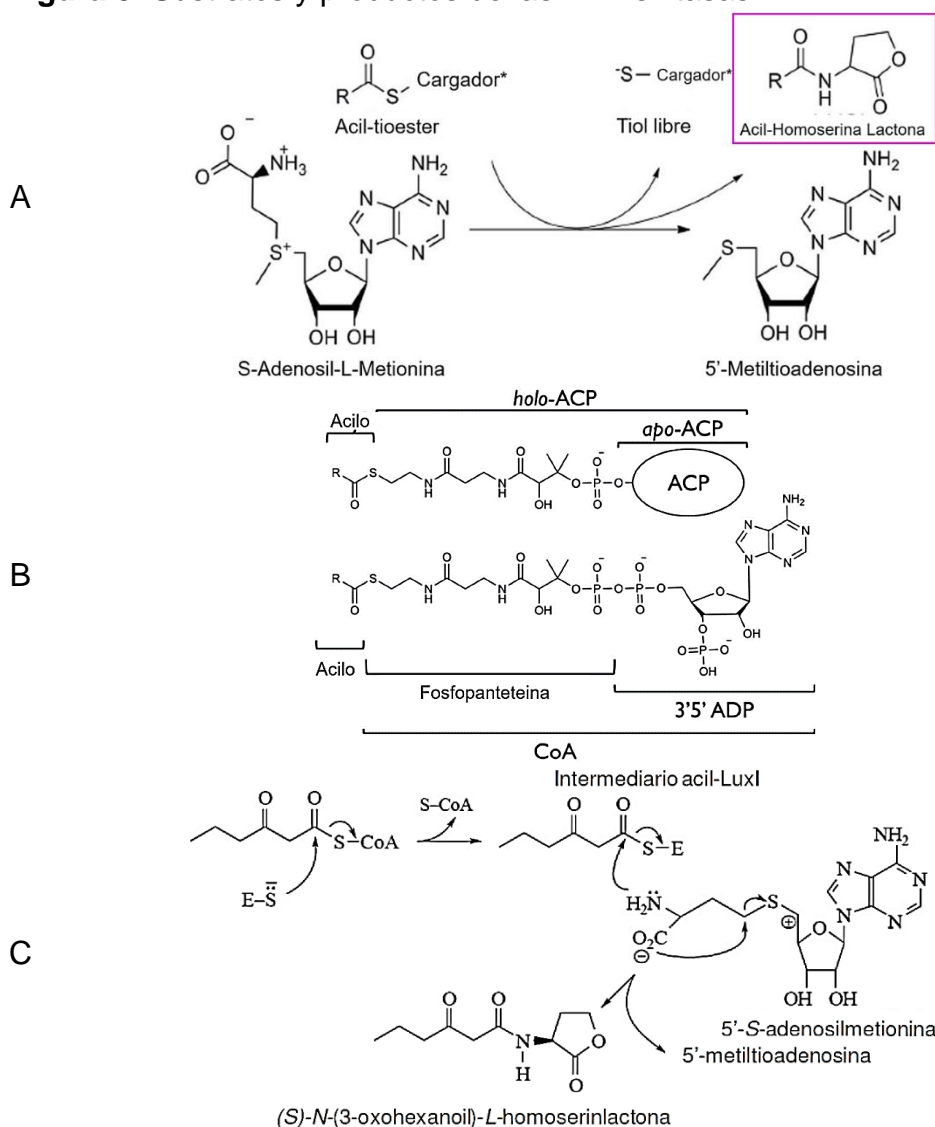
Gould y colaboradores (2004) propusieron que la actividad de las AHL sintasas dependientes de ACP requieren un sustrato unido a un cofactor proteico, así como un sitio de unión para el ACP en la AHL sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, LasI. Teniendo en cuenta que la mayoría de las interacciones con proteínas con ACPs son electrostáticas, se identificó un posible sitio de unión a ACP en LasI en una región que agrupa varios residuos básicos como R154, R161, L167, y R172. La mayoría de estos residuos se conservan entre otras AHL sintasas dependientes de ACP (Gould, Watson, Choi, Schweizer, & Churchill, 2004).

En ese sentido, Dong y colaboradores (2017) propusieron que la acilación activa la lactonización del sustrato posicionando el oxígeno carboxilo atacante hacia el carbono metileno adyacente al azufre para facilitar el cierre del anillo. La formación de la lactona puede ocurrir a través de un ataque nucleofílico directo tipo SN2 del oxígeno carboxilo sobre el metileno o a través de una β -eliminación tipo E2 de la metil-tioadenosina, seguida por un ataque del oxígeno carboxilo sobre la mitad vinilo resultante (Dong et al., 2017).

Las proteínas de la familia LuxR se encargan de la recepción de la señal AHL; se trata de proteínas reguladoras que se unen a AHLs específicas cuando éstas han alcanzado una concentración crítica, siendo los complejos LuxR-AHL los responsables de activar la transcripción de los genes controlados por QS (Romero & Otero, 2010). En *Vibrio fischeri*, el gen *luxR3* codifica la proteína LuxR. Las proteínas tipo LuxR poseen un dominio de unión a ligando (ABD por sus siglas en inglés *Autoinducer Binding Domain*) localizado en la región N-terminal y un dominio de unión al ADN, con un motivo estructural hélice-giro-hélice (HTH) localizado en la región C-terminal. ABD reconoce y se une a una molécula AHL afín. El complejo formado por la proteína receptora tipo LuxR unida a la molécula señal tipo AHL promueve el desenmascaramiento del extremo C-terminal (dominio de unión al ADN), promueve la interacción entre el dominio y el ADN y activa la transcripción de varios genes controlados por QS (Rajput & Kumar, 2017).

Las proteínas tipo LuxR canónicas se unen a las AHLs, las cuales inducen la dimerización de la proteína, la unión al ADN y la activación de la ARN polimerasa. A baja densidad celular, en ausencia de AIs, la mayoría de las proteínas tipo LuxR no se multimerizan y por lo tanto son degradadas por proteasas. En contraste, los complejos LuxR-AHL son estables y se unen al ADN para activar la transcripción de los genes blanco de QS (Chen et al., 2012; Passador, Cook, Gambello, Rust, & Iglewski, 1993).

Diferentes estudios sugieren que las proteínas tipo LuxR se localizan en el citoplasma o están débilmente asociadas con la cara interna de la membrana citoplasmática. La interacción con las AHLs dentro del dominio N-terminal desencadena cambios conformacionales en las proteínas tipo LuxR que estimulan la multimerización y unión al ADN. Una vez multimerizadas, las proteínas tipo LuxR reconocen secuencias de ADN conservadas corriente arriba de los genes blanco. La activación transcripcional del promotor asociado ocurre posterior a la unión del complejo LuxR-AHL a las regiones del ADN afines (C. Fuqua & Greenberg, 2002).

Figura 3. Sustratos y productos de las AHL sintasas

A) AHL sintasas catalizan la reacción entre dos sustratos, con la consecuente formación de tres productos. El grupo acilo sustrato está unido como un tioéster a un cargador de acilo: ya sea una proteína cargadora de acilo (Acil-ACP), o a una Acil-Coenzima A (Acil-CoA). B) Comparación de las estructuras de Acil-ACP y Acil-CoA. Ambos cargadores tienen una mitad acil-fosfopanteteina. A y B tomadas de (Christensen et al., 2014). C) Mecanismo propuesto de síntesis de la 3-Oxo-Hexanoil-homoserín Lactona en el que el donador del grupo acilo es la 3-Oxo-Hexanoil-CoA (Cuadrado Silva, 2009).

La interacción con AIs se da a través de residuos de aminoácidos polares en la región N-terminal, y además con tres residuos de triptófano altamente conservados,

que tienen contacto con la mitad homoserina lactona del Als, lo cual define la orientación de la unión. Los residuos que proporcionan interacciones hidrofóbicas y de van der Waals con las cadenas acilo son menos conservados. Las cadenas acilo pueden ocupar el bolsillo de unión a ligando en diferentes configuraciones: las cadenas cortas están extendidas y apuntan hacia el solvente, mientras que cadenas largas se pliegan y enfrentan la cara interna del bolsillo. Aparentemente, la especificidad de unión a AHLs de las proteínas tipo LuxR se da por la variación de residuos de aminoácidos que tiene efectos sobre la flexibilidad en el bolsillo (Papenfort & Bassler, 2016).

Por ejemplo, en la determinación de la estructura cristalina de la proteína tipo LuxR de *Chromobacterium violaceum*, CviR, se propuso que el residuo M89 es esencial para determinar la selectividad a la longitud de las AHLs (Fan et al., 2011). Otro ejemplo de estas interacciones es el residuo F62 de TraR, que se localiza en la posición equivalente de M89 de CviR, el cual además desempeñaría un papel oclusivo al evitar el acceso del solvente a la cola acilo del Als (Vannini et al., 2002). Un alineamiento estructural entre la proteína tipo LuxR de *Escherichia coli*, SdiA, y CviR, con CviR unida a diferentes Als reveló que Q72 y F59 de SdiA podrían desempeñar un rol similar al de M89 de CviR, restringiendo la longitud de la cadena acilo. Otros residuos de aminoácidos estrictamente conservados entre las proteínas tipo LuxR son Y63, Y71, W95 y A110 (T. Kim et al., 2014).

Las regiones C-terminal de las proteínas tipo LuxR tienen los dominios de unión a ADN hélice-giro-hélice (HTH), los cuales son característicos de muchos factores de transcripción bacterianos (Papenfort & Bassler, 2016). Por ejemplo, el extremo C-terminal de la proteína tipo LuxR de *Agrobacterium tumefaciens*, TraR, es un conjunto de cuatro hélices que abarca el motivo HTH. La hélice de reconocimiento asociada con la secuencia de unión a ADN se proyecta en el arco mayor del ADN, proporcionando contactos con bases específicas; esta región de TraR está en una posición en el dímero TraR unido a ADN que facilitaría sus interacciones con la ARN polimerasa (C. Fuqua & Greenberg, 2002).

Estudios de rayos X sobre la estructura de CviR indican que ésta puede desarrollar conformaciones cerradas que bloquean las hélices de reconocimiento del ADN. Estos resultados son consistentes con reportes previos para otras proteínas tipo LuxR, los cuales demostraron que cambios relativamente menores en la estructura de los AIs pueden tener efectos drásticos en la actividad agonista/antagonista. De hecho, se encontró que cambios grandes en la actividad pueden resultar de reorganizaciones conformacionales de los receptores causados, a su vez, por alteraciones en el ligando o por cambios de aminoácidos en la proteína (Chen et al., 2012).

1.4. Detección, Obtención y Análisis de AHLs.

El análisis de AHLs se realiza por medio de diferentes técnicas que van desde la detección a través de bioensayos en los que se emplean bacterias reporteras conocidas como biosensores, hasta técnicas analíticas como Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) y Cromatografía de Gases (CG) acopladas a Espectrometría de Masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Charlesworth, Kimyon, Manefield, & Burns, 2015; Fekete, Rothballe, Hartmann, & Schmitt-Kopplin, 2010; J. Wang, Quan, Wang, Zhao, & Fan, 2011).

1.4.1. Ensayos de detección con biosensores bacterianos

La producción de moléculas de señalización del QS tipo AHLs se puede observar con el uso de bacterias biosensoras. Estas bacterias son cepas que originalmente contaban con circuitos funcionales de QS, a las que se les modifican los genes que codifican para las proteínas AHL-sintasas, por lo que no son capaces de producir sus respectivos AIs, pero que conservan sus sistemas receptores intactos y, por lo tanto, la capacidad de expresar un fenotipo reportero en presencia de AHLs exógenas (Kumar, Costantino, Venturi, & Steindler, 2017; Steindler & Venturi, 2007).

Los biosensores bacterianos empleados en el análisis de moléculas señal tipo AHLs se pueden clasificar tanto por el fenotipo reportero expresado (por ejemplo la bioluminiscencia, la producción de violaceína y la actividad β -galactosidasa), como por la especificidad a la longitud de la cadena acilo de los AIs que pueden detectar (Cataldi, Bianco, Palazzo, & Quaranta, 2007). Los biosensores se pueden emplear en varias técnicas, una de ellas es por bioensayo en co-cultivo con otras cepas bacterianas y utilizándolos como método de revelado en la técnica de Cromatografía en Capa Delgada (las especificaciones de esta técnica se describirán más adelante). El primer método, por lo general se aplica de la siguiente manera: colonias bacterianas, sobrenadantes de cultivos o extractos de las muestras se cultivan en contacto físico cercano con el biosensor (por ejemplo, en una caja de Petri). Después de unas horas de incubación, aparecerá una zona coloreada/fluorescente/luminiscente alrededor del sitio de siembra debido a la presencia de AHLs (Charlesworth et al., 2015; Fekete, Rothballer, et al., 2010; Kumar et al., 2017; J. Wang et al., 2011).

1.4.1.1. Biosensores que producen pigmentos

La cepa biosensora CV-026 es una mutante de *Chromobacterium violaceum*, la cual produce el pigmento púrpura violaceína en presencia de AHLs exógenas (McClellan et al., 1997). El sistema de QS de la cepa silvestre de *C. violaceum* está bajo la regulación del sistema Cvil/CviR, donde la proteína Cvil se encarga de la producción de N-hexanoil-homoserín lactona (C6-AHL), para la cual el receptor CviR es más sensible (Geisenberger et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente, el agonista más activo para CV-026 es la C6-AHL, el AI nativo de *C. violaceum*; otras AHLs que también tienen actividad inductora incluyen la 3-oxo-C6-AHL y la C8-AHL (ambas, son seis veces menos activas que la C6-AHL), 3-oxo-C8-AHL (11 veces menos activa) y C4-AHL (30 veces menos activa). La cepa CV-026 poco responde a la 3-oxo-C4-AHL, y las AHLs con cadenas aciladas de 10 o más carbonos no tienen actividad agonista sobre este

biosensor. CV-026 tampoco puede detectar ninguna 3-OH-AHL (Chen et al., 2012; Steindler & Venturi, 2007).

1.4.1.2. Biosensores bioluminiscentes

La emisión de luz por parte de bacterias es un fenómeno conocido como bioluminiscencia que está regulado por un conjunto de genes organizados en un solo operón denominado *luxCDABE*. Los genes *luxCDABE* codifican para un complejo de ácido graso reductasa en la síntesis del sustrato aldehído graso para la reacción de luminiscencia catalizadas por las subunidades *luxAB* de la enzima luciferasa (Engebrecht & Silverman, 1984; Nealson & Hastings, 1979). Los genes *lux* han sido aislados de una amplia variedad de bacterias Gram negativas como *Vibrio fischeri*, *V. harveyi* y *Photobacterium luminescens*, entre otras.

Algunos de los biosensores de QS basados en reporteros bioluminiscentes son los plásmidos pSB401, pSB1075 y pSB403 (Andersen et al., 2001; Winson et al., 1998). El plásmido pSB401 fue construido usando el operón *luxCDABE* de *P. luminescens* controlado por el gen *PluxI* junto con el fragmento de ADN *luxR* de *V. fischeri*. Cuando este plásmido es transformado en *E. coli* emite luminiscencia en respuesta a la adición exógena de AHLs de cadena acilada de tamaño mediano (C6-C8). El plásmido reportero pSB1075 basado en LasR de *Pseudomonas aeruginosa* contiene el gen *lasR*, y el promotor de *lasI* controlando la expresión del operón reportero *luxCDABE* y emite luminiscencia en respuesta a AHLs con cadena acilada lateral larga (>C10). El plásmido pSB403 se construyó de manera similar al plásmido pSB401, con la ventaja de haber sido clonado en un replicón de rango más amplio, por lo que puede ser alojado en una variedad más amplia de bacterias Gram negativas en lugar de estar limitado a *E. coli* (Kumar et al., 2017).

Se determinaron los límites de detección a diferentes AHLs en cultivos líquidos para los plásmidos pSB401 y pSB403, siendo 1nM para 3-OH-C6-AHL, 10nM para C6-AHL, 10nM para C8-AHL, 10 nM para 3-oxo-C12-AHL y 1000nM para C4-AHL

(Andersen et al., 2001). El plásmido pSB1075 responde bien a 3-oxo-C12-AHL, 3-oxo-C10-AHL y C12-AHL (Steindler & Venturi, 2007).

1.4.1.3. Biosensores que producen la proteína verde fluorescente (*gfp*)

Dos plásmidos biosensores basados en la producción de *gfp* que responden a un espectro variado de moléculas señal de QS tipo AHLs son pKR-C12 y pAS-C8 (Riedel et al., 2001). El plásmido pKR-C12 se basa en los componentes del sistema Las de *P. aeruginosa* PAO1, contiene una fusión traslacional de los genes *lasB-gfp* (ASV) junto con el gen *lasR* que se encuentra bajo el control de un promotor tipo *lac*, clonados en el plásmido de amplio rango de hospederos pBBR1MCS-5, lo que permite la transferencia del constructo a varias cepas AHL-negativas. Se sabe que pKR-C12 es más sensible a 3-oxo-C12-AHL, pero también puede detectar 3-oxo-C10-AHL, C10-AHL y C12-AHL. El plásmido pAS-C8 se basa en el sistema de QS de *Burkholderia cepacia* y contiene una fusión *cepl-gfp* (ASV) junto con el gen regulador *cepR* que se encuentra bajo el control del plásmido *lac*. El biosensor pAS-C8 es más sensible a C8-AHL (Kumar et al., 2017).

Otro biosensor, la cepa W19 se construyó durante el desarrollo de un trabajo de investigación del grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas mediante la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α . Esta cepa es incapaz de producir AHLs, pero en presencia de AHLs exógenas e IPTG es capaz de producir *gfp*. Expresa al receptor LuxR bajo el control del promotor del operón Lac, también posee el promotor *luxbox* que controla la expresión del gen reportero *gfp* (Fernandez-Niño et al., 2017; Fernandez, 2011).

1.4.1.4. Biosensores que producen β -Galactosidasa

La β -Galactosidasa (β -Gal) es una enzima que cataliza la hidrólisis de varios β -Galactósidos, junto con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil galactósido (X-Gal), que es un azúcar unido mediante un enlace glucosídico a una molécula indolil han sido usados como sistemas reporteros en la construcción de biosensores

bacterianos. El X-Gal permanece incoloro mientras que el cromóforo permanezca unido a la galactosa; tras la hidrólisis en presencia de la enzima β -Gal, produce un derivado insoluble de color azul que permite visualizar la actividad de la enzima (Kumar et al., 2017).

Los biosensores para AHL basados en el sistema TraI/TraR de *Agrobacterium tumefaciens* detectan un amplio rango de AHLs y también muestran la mayor sensibilidad a estos compuestos (Farrand et al., 2002). El Sistema de QS TraI/TraR en *A. tumefaciens* está involucrado en la regulación de la transferencia por conjugación de muchos plásmidos. El circuito TraI/TraR se localiza en el plásmido Ti y produce y responde a la 3-oxo-C8-AHL, a partir de este sistema se construyó el biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4), curada del plásmido Ti y, por lo tanto, incapaz de producir AHLs. El plásmido contiene el gen *traR* y uno de los operones *tra* responsable de la transferencia conjugada del plásmido Ti, además de una fusión reportera del sistema *traG::lacZ*, encargados de la producción de la enzima β -Gal en respuesta a AHLs exógenas. De todos los biosensores construidos hasta el momento, *A. tumefaciens* pZLR4 es el que puede detectar la mayor cantidad de AHLs a las concentraciones más bajas. Entre las AHLs a las cuales responde pZLR4 están las 3-oxo AHLs en un rango entre 4 a 12 carbonos, las AHLs entre C6 y C12 no sustituidas en C3, y las 3-OH-C6, 3-OH-C8 y 3-OH-C10 AHLs (Cha, Gao, Chen, Shaw, & Farrand, 1998; Shaw et al., 1997; Steindler & Venturi, 2007).

Llamas y colaboradores construyeron un biosensor basado en el sistema SinI/SinR de *Sinorhizobium meliloti*; este sistema regula la producción de AHLs de cadena larga como C12-AHL, C14-AHL, C16-AHL y C18 AHL. Este biosensor tiene mayor afinidad por 3-oxo-C14-AHL y C16-AHL (Kalia, 2013; Llamas, Keshavan, & González, 2004; Steindler & Venturi, 2007).

1.4.2. Extracción de AHLs

Normalmente, las moléculas de señalización se encuentran a muy bajas concentraciones, por ejemplo la concentración umbral de AHLs en *Pseudomonas putida* es de 30 nM, (Fekete, Kuttler, et al., 2010; A. Meyer et al., 2012), Whitehead y colaboradores (2001) reportaron que la concentración umbral de AHLs en distintas bacterias oscila en un rango entre 10 a 50 nM (Whitehead et al., 2001); por lo que es necesario realizar extracciones con solventes orgánicos a partir de un gran volumen de cultivos bacterianos. Los medios de cultivo generalmente utilizados son los caldos Luria-Bertani y el caldo nutritivo, aunque la elección del medio de cultivo puede depender de algunos requerimientos específicos de cada bacteria (Osorno et al., 2011). Para reducir la concentración de productos del metabolismo central de las bacterias y los nutrientes del medio de cultivo, es recomendable hacer la extracción cuando el crecimiento de las bacterias haya alcanzado la fase estacionaria. La extracción líquido-líquido es el método de extracción de AHLs más común (Shaw et al., 1997; J. Wang et al., 2011).

Los solventes para la extracción de AHLs más comúnmente empleados incluyen diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, etil-éter y hexano (J. Wang et al., 2011). El rendimiento de la extracción no depende del medio utilizado, sino que el rendimiento aumenta con un incremento en la polaridad de las AHLs. En general, los sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria se extraen con una proporción 1:1 en volumen de acetato de etilo acidificado (ácido acético al 0,5%), por triplicado. Se toma la fase orgánica y se evapora el solvente por rota-evaporación (40 - 45°C). El residuo se re-suspende y se almacena para posteriores análisis (Fekete et al., 2007; Fekete, Rothballer, et al., 2010; Geisenberger et al., 2000; Mcclean et al., 1997; Ortori et al., 2011; Osorno et al., 2011; J. Wang et al., 2011).

La inyección directa de los extractos crudos puede afectar la separación o puede dañar las columnas cromatográficas debido a la presencia de componentes poco volátiles presentes en el medio de cultivo o producidos por las bacterias, razón por la cual se recomienda un pretratamiento de las muestras que involucra pasos de

purificación, como cromatografía en columnas con resinas C18 en fase reversa aplicando un gradiente discontinuo de metanol:agua y la posterior filtración de las fracciones obtenidas (Osorno et al., 2011; J. Wang et al., 2011).

1.4.3. Análisis cualitativo de AHLs por Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Shaw y colaboradores desarrollaron un método de separación y análisis de AHLs por CCD acoplada con biodetección. Este método proporciona un registro visual de las moléculas señal producidas por las bacterias y que pueden ser detectadas por el biosensor empleado (Shaw et al., 1997). Las AHLs extraídas de cultivos bacterianos son inyectadas en una cromatoplaaca de gel de sílice RP C18. Una vez el solvente ha sido evaporado, la cromatografía se desarrolla empleando una mezcla de metanol-agua (60:40) como fase móvil. Las moléculas señal tienen diferentes tasas de migración debido a las diferencias de polaridad que presentan y que tienen influencia en las interacciones hidrofóbicas que establecen con la fase estacionaria. Entre más fuerte sea la interacción entre los compuestos y la fase estacionaria, más lenta será la migración de las muestras con el solvente en la placa. Después de la separación, la placa se deja secar y se aplica el método de biodetección/revelado. Los compuestos se revelan cubriendo la placa con un cultivo de un biosensor bacteriano. Para este tipo de análisis se ha reportado el uso del biosensor *A. tumefaciens* pZRL4 junto con el sustrato X-Gal, de *Chromobacterium violaceum* CV-026, de biosensores luminiscentes como pSB401, pSB403 y pSB1075 y de los biosensores que producen *gfp* como pKR-C12 (Andersen et al., 2001; Cataldi et al., 2007; Charlesworth et al., 2015; Fekete et al., 2007; Mcclean et al., 1997; Riedel et al., 2001; Shaw et al., 1997; J. Wang et al., 2011).

Para este tipo de ensayo se deben tener en cuenta diferentes factores: 1) el ensayo estará limitado a aquellas AHLs a las cuales el biosensor es más sensible, 2) la molécula de señalización debe estar presente en una concentración detectable por la cepa reportera, 3) las moléculas de señalización con igual número de carbonos en su cadena lateral pero que difieren en el grado de sustitución del carbono 3 de

la cadena tienen Rfs similares, razón por la cual podrían estar solapadas (por ejemplo, Shaw y colaboradores (1997) observaron que las 3-oxo-AHLs migraban con la misma movilidad que las 3-OH-AHLs) y 4) la ausencia de una señal del reportero no necesariamente implica que la bacteria no produzca alguna AHL, esto puede significar también que la bacteria de hecho la produce, pero a una concentración a la cual el biosensor no puede detectarla (Shaw *et al.*, 1997).

1.4.4. Identificación de las AHLs

Se han implementado diferentes herramientas analíticas para la separación y análisis de AHLs entre las que se incluyen: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE), Cromatografía de Gases (CG), Espectroscopía de Masas (EM), Electroforesis Capilar (EC), Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría Infrarroja (EIR) (Fekete *et al.*, 2007). Wang y Colaboradores presentan una revisión de las técnicas anteriormente mencionadas (J. Wang *et al.*, 2011).

Cataldi y colaboradores (2004) desarrollaron un método para analizar AHLs por CG/EM sin necesidad de derivatizar estos compuestos. En su estudio, se optimizaron las condiciones de separación y se determinaron los tiempos de retención de las AHLs. El espectro de masa de cada compuesto exhibió un ion molecular característico para cada AHL C4-AHL (m/z 171), C6-AHL (m/z 199), C8-AHL (m/z 227), C10-AHL (m/z 255), C12-AHL (m/z 283) y C14-AHL (m/z 311). También se observó un patrón de fragmentación en el que el ion más abundante tenía una relación m/z de 143, que corresponde a la fragmentación que se da debido al re-arreglo de McLafferty. La pérdida de agua del ion a m/z 143 resulta en un fragmento a m/z 125. Otro pico a m/z 101 corresponde a un clivaje de la cadena lateral acilo en el grupo amino secundario, lo que resulta en la formación del ion molecular de la Homoserín lactona deacilada (Cataldi, Bianco, Frommberger, & Schmitt-Kopplin, 2004).

Otros autores han empleado otras técnicas de separación como CLAE y CLAP acopladas a EM en modo SIM para el análisis y la identificación de AHLs (Fekete et al., 2007; Li et al., 2006; J. Wang et al., 2011). La elucidación estructural de las AHLs se hace utilizando los métodos espectroscópicos convencionales como lo son RMN y EM. También, aprovechando el hecho de que muchas de las estructuras de las AHLs se han elucidado, se ha optado por hacer comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por CG o CLAE, y de sus espectros de masas. Para esto se emplean patrones comerciales y se comparan con los extractos objeto de estudio. Una ventaja adicional de las técnicas cromatográficas es que permite su cuantificación y detección a concentraciones muy bajas que por RMN no siempre es posible (Cuadrado-Silva, Castellanos, Arévalo-Ferro, & Osorno, 2013).

El índice de retención de compuestos alifáticos de cadena larga (cadena acilo de las AHLs), se puede calcular de acuerdo con la Ecuación 1; donde N es el número de átomos de carbono en la cadena alquilo, FG es un incremento del grupo funcional y Me es un incremento por cada grupo metilo dependiendo de la posición en la cadena. Los valores de Me en una fase apolar de cromatografía de gases ya se encuentran reportados. En general, los índices de retención calculados y medidos no difieren por más de 5-8 unidades (Thiel, Kunze, Verma, Wagner-döbler, & Schulz, 2009).

Ecuación 1

$$I_c = N + FG + \sum Me_i$$

La identificación tentativa de compuestos como las AHLs se puede hacer por comparación de los índices de retención de los patrones sintéticos y con la base de datos de espectros de masas NIST (NIST/EPA *Mass Spectra Library* <https://chemdata.nist.gov/>). Para la asignación tentativa de los picos mediante los resultados arrojados por la base de datos, se tomará como criterio un porcentaje de similitud >90% entre el espectro de masas del compuesto y el compuesto más similar y se calculan los índices de retención; para este cálculo, es necesario aplicar el mismo método de análisis en una mezcla de parafinas de diferentes tamaños. Los índices de retención también pueden calcularse mediante la Ecuación 2.

Ecuación 2

$$IR = 100 \times \left(\frac{t_{r(x)} - t_{r(n-1)}}{t_{r(n+1)} - t_{r(n-1)}} + nC_{(n-1)} \right)$$

Donde $t_{r(x)}$ es el tiempo de retención del analito; $t_{r(n-1)}$ es el tiempo de retención de la parafina que eluye inmediatamente *antes* del analito; $t_{r(n+1)}$ es el tiempo de retención de la parafina que eluye inmediatamente *después* del analito; y $nC_{(n-1)}$ es el número de carbonos de la parafina que eluye inmediatamente *antes* del analito.

Finalmente, Osorno y colaboradores (Osorno et al., 2011) hacen una revisión de los diferentes tipos de AHLs que han sido caracterizadas mediante técnicas cromatográficas, como los trabajos de Cataldi, Pomini, Götz, Wagner y Döbler (Cataldi et al., 2007; Li et al., 2006; Osorno et al., 2011; Pomini, Araújo, & Marsaioli, 2006; Sharp, Ritchie, Schupp, Ritson-Williams, & Paul, 2010; Thiel et al., 2009). En trabajos más recientes se han aplicado estas técnicas en el análisis de moléculas señal producidas por bacterias en diversos ambientes (Britstein et al., 2015; Kher et al., 2019).

OBJETIVOS

Objetivo General.

Evaluar la presencia del fenómeno de *Quorum Sensing* en aislamientos bacterianos marinos identificados como *Stappia indica*.

Objetivos Específicos.

- Evaluar la producción de moléculas de señalización del QS por parte de aislamientos identificados como *S. indica* utilizando biosensores específicos para AHLs.
- Caracterizar las moléculas de señalización producidas por *Stappia indica* CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21, CCBBBdMc-11 y CCBhMc-3, mediante Cromatografía en Capa Delgada.
- Identificar posibles genes involucrados en el fenómeno de QS en *Stappia indica* CCBhMc-3 por medio de análisis bioinformáticos.

METODOLOGÍA

1. Cepas de Estudio.

Las bacterias objeto del presente trabajo de investigación hacen parte del cepario del grupo de investigación Comunicación y Comunidades Bacterianas del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Fueron aisladas y purificadas en un trabajo previo del grupo realizado por Díaz y Ripe (2016), en el que se estudiaron las comunidades bacterianas cultivables aisladas de muestras de los corales *Orbicella faveolata* y *Montastrea cavernosa*, sanos y con enfermedad de Banda Negra del Caribe colombiano (Díaz Sana & Ripe Jaime, 2016). Once cepas fueron asociadas de forma preliminar con *S. indica*, cuatro aislamientos del coral *O. faveolata* enfermo (CCBBBdOf-2, CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21), uno de *O. faveolata* sano (CCBhOf-14), tres del coral *M. cavernosa* sano y tres más del enfermo (CCBhMc-3, CCBhMc-8, CCBhMc-7 y CCBBBdMc-3, CCBBBdMc-11, CCBBBdMc-12, respectivamente).

El estudio de Díaz y Ripe (2016), se enmarcó en el proyecto financiado por Colciencias denominado: "*Design of a microarray tool to catalogue bacterial populations associated with coral diseases*", y se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología asociado al departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, dentro del grupo de investigación Comunicación y Comunidades Bacterianas (CCB) dirigido por la profesora Catalina Arévalo-Ferro.

El muestreo de los corales objeto de estudio en este trabajo se hizo teniendo en cuenta lo descrito en el Anexo 2 del Permiso Marco de Investigación Científica en Diversidad Biológica N°4 del 10 de febrero de 2010, expedido por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, resolución 0865, que permite al grupo de investigación realizar la colecta de muestras de corales para desarrollar el proyecto global de investigación denominado "Perspectivas de bacterias marinas del Caribe colombiano como fuente de compuestos bioactivos", y en el Permiso de Investigación en Diversidad Biológica N° 8 del 19 de abril de 2010.

2. Caracterización taxonómica de las cepas de estudio

2.1. Caracterización morfológica

Para la caracterización de la morfología microscópica se hizo tinción de Gram según lo descrito por Beveridge (Beveridge, 2001). Brevemente, se tomaron colonias aisladas de un cultivo joven (24h) de cada una de las muestras, se esparcieron sobre portaobjetos y se aplicó el siguiente procedimiento: i) tinción primaria con cristal violeta (60 segundos); ii) fijación del cristal violeta, usando Lugol como mordiente (60 segundos); iii) decoloración con una solución de alcohol-acetona (30 segundos); y iv) contra-tinción con una solución de fucsina (60 segundos). Las muestras se observaron en un microscopio óptico binocular marca Nikon ECLIPSE E100 con un objetivo de 100x.

En la caracterización de la morfología macroscópica, se observaron y analizaron las colonias formadas por cada aislamiento en un estereoscopio Zeiss Stemi DV4, considerando criterios clásicos como el tamaño, la pigmentación, forma, elevación y aspecto de la superficie, definidos para las proteobacterias en el Volumen 2 del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Boone *et al.*, 2001).

2.2. Caracterización Bioquímica

Se evaluó la capacidad de cada aislamiento bacteriano para degradar diferentes carbohidratos y aminoácidos, así como la producción de diferentes enzimas como catalasa, triptofanasa, ureasa, lipasas y proteasa. También se llevaron a cabo pruebas para establecer las rutas metabólicas usadas por las bacterias, como la oxidación/fermentación de carbohidratos, desaminación y/o descarboxilación de aminoácidos y, finalmente pruebas para el uso de un solo sustrato como única fuente de carbono y energía.

Metodología

Se prepararon los medios de cada una de las pruebas bioquímicas en tubos de ensayo; se prepararon cultivos de cada cepa, por 24 horas a 37°C en agar LB. Se tomó una colonia de cada aislamiento para inocular cada uno de los sustratos anteriormente mencionados. Todas las pruebas se hicieron por triplicado para cada bacteria y se incubaron por 24 horas a 37°C para su posterior lectura e interpretación. Las pruebas realizadas y las cepas control se encuentran descritas en el libro de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2000) y resumidas en la Tabla 1, (página 42).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización bacteriana.

Prueba	Medio empleado	Identificación positiva		Control positivo	Ref	
Lisina Descarboxilasa / Desaminasa Producción de H ₂ S	Lisina Hierro Agar	M/M ¹	Precipitado negro	<i>Escherichia coli</i>	(Ewing, Davis, & Edwards, 1960)	
		R/A ²				
Oxidación / Fermentación de Glucosa	Agar OF	Incremento de acidez, cambio del medio de verde a amarillo		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Hugh & Leifson, 1953)	
Ureasa	Caldo Urea	Incremento alcalinidad, cambio Del medio de amarillo a rojo/ fucsia		<i>Klebsiella sp.</i>	(Rustigian & Stuart, 1941)	
Catalasa	2-3 gotas de H ₂ O ₂	Formación de burbujas por descomposición de H ₂ O ₂		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(G. I. Wang, 1985)	
Motilidad	Agar SIM	Medio turbio		<i>Escherichia coli</i>	(Costin, 1977)	
Producción de indol		Halo rojo con reactivo de Kovacs		<i>Escherichia coli</i>		
Producción de H ₂ S		Precipitado negro		<i>Shigella flexneri</i>		
Descomposición del Citrato	Agar Citrato Simmons	Incremento alcalinidad, cambio del medio de verde a azul		<i>Salmonella tiphimurium</i>	(Simmons, 1926)	
Reducción de Nitratos	Caldo Nitrato	Cambio de coloración al agregar reactivo A y B ³ De amarillo a rojo/fucsia		<i>Escherichia coli</i>	(Muftić & Hunt, 2013)	
Lipasas	<i>Tween</i> (80) y (20)	Halo		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Arevalo- Ferro et al., 2003)	
Proteasa	Agar Leche	Halo				
Fermentación De Azucares	Glucosa	Caldo Rojo de Fenol	Incremento de acidez, cambio del medio de rojo a amarillo		<i>Klebsiella sp.</i> <i>Escherichia coli</i>	(Muftić & Hunt, 2013)
	Lactosa					
	Sacarosa					
	Manitol					
Fermentación De Azucares	Glucosa	Agar Hierro tres azucares de Kligler	K/A ⁴	Precipitado negro	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp.</i>	(Sulkin & Willett, 1940)
	Lactosa		A/A ⁵			
	Sacarosa					

¹M/M (Pico de color morado y fondo morado)

²R/A (Pico de color rojo y fondo amarillo)

³reactivo A (ácido sulfanílico al 0.8% en ácido acético glacial 5N) y reactivo B (α-naftilamina al 0.5% en ácido acético glacial 5N)

⁴K/A (Pico de color naranja y fondo amarillo)

⁵A/A (Pico y fondo de color amarillo)

2.3. Caracterización Molecular

2.3.1. Extracción de ADN y amplificación del gen rADN 16S por PCR.

Para la asignación de especie, se extrajo ADN de los aislamientos bacterianos por choque térmico. Para esto, se re suspendió una colonia de un cultivo puro en 100 µL de agua destilada por autoclave, se llevó a una temperatura de 100°C por diez minutos y luego se enfrió hasta -4°C por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se utilizó para amplificar el ADNr 16S utilizando los *primers* universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 30 µl, que contenían buffer de amplificación 5 mM, MgSO₄ 0.6 mM, deoxiribonucleótido trifosfatos 0.4 mM, 0.4 mM de cada *primer* y 0.1 U de *Taq Platinum Pfx* ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, con un paso final de extensión de 72 °C por 7 min. Los productos de la PCR fueron purificados y su secuencia se realizó por servicios técnicos usando el método Sanger (Barbosa Cárdenas, 2012; Franco, 2015; Sanger & Coulson, 1975).

2.3.2. Análisis Taxonómico

La asignación de especies se realizó mediante la comparación de secuencias. Para esto, se construyó una secuencia consenso (*contig*) del gen de ADNr 16S usando la herramienta CAP (*Contig Assembly Program*) del programa BioEdit con los parámetros determinados por defecto del algoritmo (Hall, Biosciences, & Carlsbad, 2011; Huang, 1992), luego, se comparó cada *contig* con la base de datos del *GenBank* usando la herramienta BLASTN para encontrar las secuencias con el

porcentaje de identidad más alto dentro de la colección de nucleótidos completa del *GenBank*, tomando como parámetro que el porcentaje de identidad fuera igual o mayor a 97%, valor a partir del cual, según diferentes autores se pueden afiliar las secuencias al nivel taxonómico de especie (Rosselló-Mora, 2005; Stackebrandt & Rainey, 1995). Se obtuvieron secuencias curadas de especies de referencia de la base de datos del *List of Prokaryote names with Standing in Nomenclature* (LPSN) (EUZÉBY, 1997) para posteriores análisis.

Las secuencias se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW, en el programa BioEdit (Hall *et al.*, 2011; Thompson, Higgins, & Gibson, 1994). Los parámetros de alineamiento dependían de la similitud de las secuencias, en donde, para especies del mismo género la apertura de *gaps* y de extensión de estos tenían valores de 50 y 16,6 puntos respectivamente. Los alineamientos fueron exportados al programa Mega 6.0 donde se construyeron las matrices de distancia p, Kimura 2 parámetros y máxima probabilidad (M Kimura, 1981; Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) y los respectivos dendrogramas con los métodos de agrupamiento *Neighbour-Joining* (Saitou & Nei, 1987) y *Maximum Likelihood*. La validación estadística de los agrupamientos se evaluó con el método *bootstrap* con 1000 réplicas.

2.4. Evaluación de las condiciones de crecimiento óptimo de las cepas de estudio.

Mediante la modificación de variables fisicoquímicas específicas se buscaron las condiciones óptimas de crecimiento de cultivo para cinco de las cepas de estudio. Las condiciones tenidas en cuenta fueron la concentración de cloruro de sodio (% p/v NaCl 0.5, 1, 3.5, 6.5, 11 y 15), pH (4.5, 5.5, 7, 8 y 9) y temperatura. (4°C, 9°C, 15°C, 28°C y 37°C). Se prepararon caldos de cultivo Luria Bertani (cLB) con las condiciones anteriormente descritas ajustadas, se inocularon y se cultivaron aeróbicamente. El crecimiento bacteriano fue monitoreado por el aumento de la densidad óptica del cultivo (DO), medida en un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo) a 600 nm, tomando mediciones por triplicado cada doce (12) horas.

Las condiciones fisicoquímicas óptimas de crecimiento se determinaron para cada una de las cepas para conocer el tiempo en el que el cultivo alcanza la fase estacionaria, y de esta forma determinar el punto de extracción de metabolitos como las Acil-Homoserín Lactonas (AHLs), debido a que en este punto se encuentra la mayor concentración de estas moléculas en el cultivo líquido. Se construyeron entonces curvas de crecimiento como sigue: en primer, lugar se prepararon preinóculos, de 50mL en cLB con las condiciones de temperatura, pH y salinidad óptimas ajustadas, se dejaron incubando *overnight* en agitación constante (200 rpm). Posterior a esto, se tomaron 25 mL de cada preinóculo y se llevaron hasta un volumen final de 250 mL de cLB, nuevamente, con las condiciones de salinidad, pH y temperatura ajustadas. Los caldos se incubaron en agitación constante y se hicieron mediciones de la densidad óptica (DO) a 600 y 595 nm cada hora hasta alcanzar un valor de DO constante. Las curvas fueron realizadas por triplicado, para cada una de las cepas de estudio; con los datos obtenidos, se construyeron las gráficas de la densidad óptica promedio en función del tiempo y se tuvieron en cuenta la desviación estándar en cada punto, así como el coeficiente de variación.

3. Análisis de las moléculas de señalización AHLs producidas por *Stappia indica*.

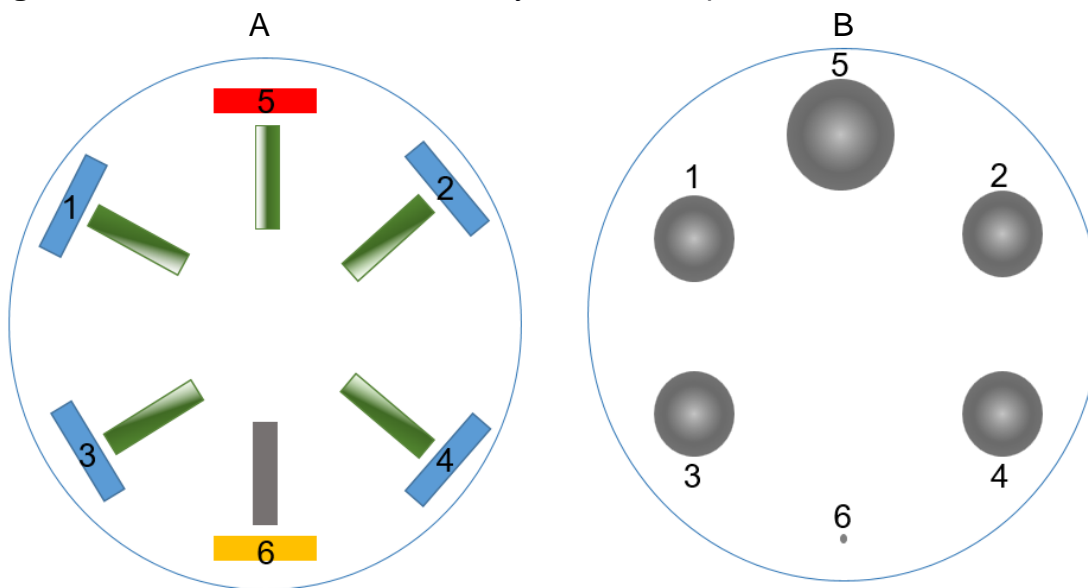
3.1. *Co-cultivos: ensayos de detección de las moléculas de señalización AHLs producidas por Stappia indica.*

Para la detección de las moléculas de interés, se llevaron a cabo ensayos de siembra en T (Ver Figura 4, en la página 46) y siembra en punto, utilizando los diferentes biosensores mencionados en la Tabla 2, (página 48).

En el ensayo de siembra en T, en medio LB sólido, se trazaron estrías perpendiculares en las que se enfrentaba la bacteria de estudio contra la cepa biosensora. El objetivo de este tipo de ensayo es ver un gradiente en la expresión del gen reportero que progresa sobre la estría del biosensor, y que es inducida por AHLs exógenas (provenientes de las cepas de estudio y del control positivo).

En el ensayo de siembra en punto, se prepararon preinóculos de los biosensores en caldo LB, cada preinóculo fue suplementado con el antibiótico requerido para cada biosensor (pKR-C12: Gentamicina, Cf 0,025 mg/mL + Kanamicina, Cf 0,01mg/mL; pSB403: Tetraciclina, Cf 0,01 mg/mL y W19: Kanamicina, Cf 0,01 mg/mL) y se incubó *overnight* a temperatura y agitación constante (28°C y 200 rpm respectivamente). Posteriormente, se tomaron 4 mL de cada uno de los preinóculos de biosensores y se llevaron, cada uno por separado, a un volumen final de 40 mL de agar LB, esta mezcla fue homogenizada y se permitió que solidificara el medio.

Figura 4. Modelos de Siembra en 'T' y siembra en punto.



- A. Modelo de Siembra en T entre las cepas problema (estrías azules), las cepas control (Control positivo: estría roja; Control negativo: estría amarilla), y la cepa biosensora (Estrías verdes: fenotipo reportero inducido; estría gris: fenotipo reportero no inducido). Este ensayo fue tomado y modificado de Steindler & Venturi (Steindler & Venturi, 2007).
- B. Modelo de siembra en punto. Sobre agar previamente inoculado con el biosensor se realizan punciones con las bacterias de estudio. El resultado es la inducción del fenotipo reportero en forma de halo del biosensor. En todos los casos, los números 1 a 4 representan cepas problema distintas, 5 corresponde al control positivo y 6 al control negativo.

Con ayuda de una aguja de inoculación, se tomaron muestras de colonias aisladas de las bacterias analizadas y de los controles y se realizaron punciones sobre el medio previamente inoculado con el biosensor. Se dejaron incubando por 18 horas

a temperatura constante (28°C). El objetivo de este ensayo fue apreciar halos de inducción en la expresión del gen reportero del biosensor por efecto de las moléculas señal producidas por las bacterias problema y el control positivo. En la Tabla 3 (página 48), se muestran las cepas bacterianas de control empleadas en los ensayos de detección. Los resultados de estos ensayos se visualizaron en un fotodocumentador BioRad, haciendo uso de un filtro UV.

3.2. Extracción de las moléculas de señalización AHLs

A partir de los cultivos líquidos de i) los aislamientos problema (CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21, CCBBBdMc-11 y CCBhMc-3) ii) las cepas control *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (control positivo) y *Pseudomonas putida* (IsoF117, control negativo) y iii) el blanco de referencia (cLB sin inocular), se realizaron las extracciones según los protocolos descritos por Franco y Cuadrado (Cuadrado-Silva et al., 2013; Franco, Cadavid, & Ferro, 2015), donde se incluyeron etapas de centrifugación, filtración y separación. Las cepas control fueron cultivadas en cLB, por 18 horas a 37°C y en agitación constante (200 rpm).

Para cada aislamiento se preparó un preinóculo que se incubó a temperatura y agitación constante durante 18 horas, de acuerdo con los resultados de las condiciones óptimas de crecimiento evaluadas en el apartado 2.4 de la metodología (Ver página 44), en las que ya se había establecido el tiempo que le tomaba a cada uno de los aislamientos alcanzar la fase estacionaria.

Las extracciones se prepararon como sigue. Volúmenes de 270 mL de caldo LB se inocularon con 30 mL de cada uno de los preinóculos de las bacterias problema y, como se mencionó anteriormente, se incubaron a temperatura y agitación constantes según los datos obtenidos en la sección 2.4. Las cepas control y el blanco fueron cultivados en cLB, por 18 horas a 37°C y en agitación constante (200 rpm).

Una vez superado el punto medio de la fase exponencial para cada muestra, se detuvo el crecimiento bacteriano. Los cultivos se centrifugaron a 15000 rpm durante 30 minutos, se recuperaron los sobrenadantes y se acidificaron con ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 3. Posterior a la acidificación, cada sobrenadante se sometió a filtraciones sucesivas en filtros de membrana de 0,45µm y 0,22 µm. Las moléculas señal se extrajeron tres veces usando volúmenes iguales de acetato de etilo (500:500 sobrenadante:acetato de etilo). Se recuperó la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad. Los extractos secos fueron almacenados para posteriores análisis.

Tabla 2. Diferentes biosensores para Acil Homoserín Lactonas.

Biosensor	Hospedero	Basado en el sistema QS	Sistema reportero	Responde mejor a	Buena detección de
pSB403	<i>Escherichia coli</i>	LuxI/LuxR	Bioluminiscencia	C6 y C8 AHL	C10 y C12 AHL
pKR-C12	<i>Pseudomonas putida</i>	LasI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	Producción de proteína verde fluorescente (<i>gfp</i>)	C12-3-oxo-AHL	C10-3-oxo-AHL
CV-026	<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviiI/R (<i>C. violaceum</i>)	Producción del pigmento violaceína	C6-AHL	C6-3-oxo-AHL; C8-AHL; C8-3-oxo-AHL; C4-AHL
W19	<i>Escherichia coli</i>	LuxI/LuxR	Producción de proteína verde fluorescente (<i>gfp</i>)	C12-3-oxo-AHL	C10-3-oxo-AHL
PZLR4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TralI/R (<i>A. tumefaciens</i>)	Actividad β-galactosidasa	C8-3-oxo-AHL	Todas las 3-oxo-AHLs; C6-AHL; C8-AHL; C10-AHL; C12-AHL; C14-AHL; C6-3-hidroxi-AHL; C8-3-hidroxi-AHL; C10-3-hidroxi-AHL.

Tomado y adaptado de Steindler (2007) y Winson *et al.*, (1998) (Steindler & Venturi, 2007; Winson *et al.*, 1998)

Tabla 3. Cepas control para los ensayos con biosensores

Cepas control	Hospedero	Molécula de señalización
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-AHL; C6-AHL; C8-AHL; C10-AHL; C12-AHL
IsoF	<i>Pseudomonas putida</i>	C6-3-oxo-AHL; C6-AHL; C8-AHL; C8-3-oxo-AHL; C4-AHL
IsoF117	<i>Pseudomonas putida</i>	No produce AHLs

PAO1 e IsoF controles positivos, IsoF117 control negativo.

3.3. Purificación de los extractos de AHLs

Se realizó un pretratamiento de los extractos antes de continuar con el análisis de las moléculas señal según proponen Geisenberger, Cataldi y Osorno en sus respectivos trabajos (Cataldi et al., 2004, 2007; Geisenberger et al., 2000; Osorno et al., 2011). Para esto, se prepararon soluciones de los extractos crudos en 1 mL de una mezcla de metanol-agua 50:50, se tomaron 500 μ L de la solución y se aplicaron en cartuchos de extracción en fase sólida Supelclean™, Sigma-Aldrich, con una matriz un gramo de gel de sílice en fase reversa (RP18) empaquetada como fase estacionaria. La fase móvil empleada fue un gradiente discontinuo de metanol-agua, como sigue: fracción 1: metanol-agua 10:90; fracción 2: metanol-agua 30:70; fracción 3: metanol-agua 50:50; fracción 4: metanol-agua 70:30 y fracción 5: metanol.

Los cartuchos fueron ubicados sobre un colector acoplado a una bomba de vacío. Se hicieron tres lavados con 5 mL de cada una de las fracciones, y los volúmenes recuperados fueron evaporados hasta sequedad en un Rotavapor Heidolph a temperatura y presión controladas. Sobre cada fracción obtenida se hicieron ensayos de actividad de inducción de los fenotipos reporteros de los biosensores bacterianos, de acuerdo a la metodología del apartado 3.1 (Ver página 45).

3.4. Análisis de AHLs por Cromatografía en Capa Delgada

En este trabajo se empleó el análisis cualitativo de las moléculas de señalización producidas por las cepas de estudio (CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21, CCBBBdMc-11 y CCBhMc-3) por el método de cromatografía en Capa Delgada de acuerdo con lo descrito por Geisenberger *et. al.*, Steindler & Venturi, Franco y López-Fernández (Franco, 2015; Geisenberger et al., 2000; López Fernández, 2012; Steindler & Venturi, 2007).

Se empleó una lámina de gel de sílice en fase reversa (RP18) como fase estacionaria. Se prepararon soluciones de cada uno de los extractos (1 mg/ mL) en

acetato de etilo. Se transfirieron diez microlitros de cada extracto a un capilar y se sembraron a dos centímetros de la base de la lámina. La fase móvil empleada fue una mezcla de Metanol-Agua a una proporción de 60:40, una vez terminó de correr la cromatografía, se dejó secar la lámina y se reveló cubriéndola con 200 mL de un cultivo semisólido de *Agrobacterium tumefaciens* pZLR4 en medio ABG, el cual también contenía Gentamicina (Cf 0,05 mg/mL) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido; Cf 0,04 mg/mL).

En presencia de moléculas señal tipo AHLs exógenas, el biosensor *A. tumefaciens* produce la enzima β -galactosidasa, la cual degrada el sustrato indicador X-Gal, formando puntos azules en los lugares en los que la molécula señal induce la expresión de la enzima. Los puntos revelados se comparan con los revelados en la línea de la cepa control (extracto de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1), y las AHLs sintéticas usadas como referencia.

3.5. Análisis de AHLs por Cromatografía de Gases

Se prepararon soluciones stock de los patrones de acil Homoserín lactonas sintéticos (Sigma), referenciados en la Tabla 4 de la página 50 a una concentración final de 1mg/ml en cloroformo.

Tabla 4. Patrones de Acil Homoserín Lactonas empleados para el análisis por CG.

Patrón de Homoserin lactona (AHL)	Acrónimo	Punto de fusión (°C)
N-butanoil AHL	BAHL	89.8
N-hexanoil AHL	HAHL	102.6
N-octanoil AHL	O AHL	105.8
N-decanoil AHL	DAHL	112.5
N-dodecanoil AHL	dDAHL	115.3

Los análisis por CG-EM de los patrones sintéticos se hicieron en las instalaciones del laboratorio del grupo de investigación Química de Hongos Macromicetos de Colombia. El protocolo empleado fue descrito por Cataldi y colaboradores (2004, 2007). Brevemente, se empleó un cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un

espectrómetro de masas HP7973 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). La inyección de la muestra se hizo en modo *split* (150:1) en una columna capilar equipado con una columna capilar TG-1MS (30 m x 0,25 mm id., 0,25 µm espesor de partícula; Thermo Scientific, Thermo Fischer Scientific, Waltham E.E.U.U). Se utilizó helio puro (99.999%) como gas de arrastre a una tasa de flujo de 0.8mL/min. La temperatura del inyector del CG se ajustó a 200°C. La temperatura del horno del cromatógrafo se optimizó en un gradiente que inició en 150°C incrementando en 15°C por minuto, hasta alcanzar una temperatura de 275°C. La línea de transferencia de temperatura se ajustó a 200°C (Cataldi et al., 2004).

Las moléculas señal tipo AHLs presentes en los extractos de las bacterias problema se separaron en por CG, en el Cromatógrafo del laboratorio de docencia de CG, del departamento de Química (Agilent Technologies 7820A GC system), equipado con una columna capilar HTC5 y un detector FID. La inyección de las muestras, el blanco y los controles se hizo en modo *Split* con una temperatura del inyector de 200°C. La identificación de los picos obtenidos se hizo con el cálculo de sus índices de retención cromatográficos (*I*) y comparación con patrones sintéticos de referencia.

4. Análisis computacional de los componentes de QS en *Stappia indica*.

La evidencia experimental sugería que *S. indica* tiene dentro de su genoma la maquinaria genética necesaria para la producción de moléculas de señalización del QS tipo AHLs. Por esta razón, la siguiente parte del trabajo consistió en hacer una búsqueda, haciendo uso de herramientas computacionales, de elementos reguladores similares a los circuitos de QS canónicos presentes en esta bacteria.

Stappia indica ya cuenta con tres genomas secuenciados disponibles en la base de datos *BioProject* del NCBI (dos de ellos de los aislamientos del grupo CCB: CCB-EBBD17 y CCB-SBBC49) y se encuentran disponibles con los siguientes números de acceso:

✚ CCB-EBBD17: PRJNA328867

✚ CCB-SBBC49: PRJNA328866

✚ USBA 352: PRJNA330487

Para la búsqueda de los posibles componentes del sistema de QS en *S. indica*, asociado con la producción y reconocimiento de moléculas señal tipo AHLs, en este trabajo se usó el genoma del aislamiento CCB-SBBC49 (que corresponde al aislamiento CCBhMc-3 del cepario del grupo de investigación CCB). El material genético necesario para la secuenciación de los genomas CCB-SBBC49 y CCB-EBBD17 fue extraído y purificado como parte del trabajo desarrollado por Díaz y Ripe en 2016, en las instalaciones de los grupos de investigación CCB y el grupo de Inmunología Evolutiva e Inmunogenética (Díaz Sana & Ripe Jaime, 2016; Henao et al., 2017). Ver Anexo 1. Reporte de genomas en *BioProject* de NCBI (aclaración). (página 118).

4.1. Búsqueda de proteínas tipo LuxI/LuxR en el genoma de *S. indica*

Se realizó una búsqueda de posibles secuencias codificantes para proteínas tipo AHL-sintasas de la familia LuxI usando la herramienta TBLASTN en el servidor NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con los parámetros del algoritmo por defecto (Matriz BLOSUM62, con penalidad de apertura de *gaps* de 11 y de extensión 1). Se usaron como referencia las secuencias de proteínas tipo LuxI recopiladas por Britstein, *et. al.* (Britstein *et al.*, 2015) (Ver Anexo 2, página 119), para buscar sus posibles homólogos dentro de las secuencias de proteínas obtenidas del genoma de *Stappia indica*. Con el resultado de la búsqueda anterior, se hicieron nuevas comparaciones entre las secuencias de proteínas de referencia y la base de datos de proteínas no redundantes, filtradas por organismo con *S. indica* (taxid:538381), este paso se hizo con la herramienta BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con los parámetros del algoritmo por

defecto (Matriz BLOSUM62, con penalidad de apertura de *gaps* de 11 y de extensión 1).

Para la búsqueda de proteínas candidatas a factores reguladores de la transcripción de la familia LuxR en el genoma de *Stappia indica*, se recopilaron secuencias de proteínas homólogas de esta familia, entre las que se incluyeron las proteínas LuxR de *Vibrio* spp, LasR y RhIR de *P. aeruginosa*, TraR de *Agrobacterium tumefaciens* y otras especies, CviR de *Chromobacterium violaceum*, entre otras (Ver Anexo 3, página 120), y se comparó con el proteoma traducido de la bacteria mediante la herramienta BLASTP, similar a como se hizo con las proteínas tipo LuxI. Una segunda estrategia fue la búsqueda en la base de datos de UniProt (Bateman *et al.*, 2017), con los términos de búsqueda “*Transcriptional Factor Regulators AND Stappia indica*”.

En la identificación de la(s) proteína(s), candidata(s) se tuvieron en cuenta los Valores esperados E y los porcentajes de cobertura y similitud. Los resultados de la búsqueda mediante las herramientas BLAST son significativos cuando los valores E son cercanos a cero, pues este valor está relacionado con la posibilidad de encontrar este mismo resultado si se hiciera una búsqueda al azar en una base de datos.

4.2. Alineamiento Múltiple de secuencias

Con el fin de comprobar la existencia de sitios conservados en las secuencias de las proteínas tipo LuxI y LuxR de *S. indica*, cada grupo de secuencias de proteínas se alineó de manera independiente utilizando los programas BioEdit y Mega (Hall *et al.*, 2011; Tamura *et al.*, 2013), junto con diferentes proteínas tipo LuxI y LuxR de referencia, respectivamente. La comparación de secuencias se hizo a través de los algoritmos ClustalW y Muscle (Edgar, 2004; Thompson *et al.*, 1994). Los alineamientos se visualizaron con la herramienta Jalview (Clamp, Cuff, Searle, & Barton, 2004; A. M. Waterhouse, Procter, Martin, Clamp, & Barton, 2009).

Posterior a la identificación de la secuencia de la proteína AHL sintasa de *S. indica* se hizo la predicción de algunas características como el peso molecular, el punto isoeléctrico teórico, composición de aminoácidos y coeficientes de extinción, estas predicciones se hicieron con la herramienta ProtParam del servidor ExPasy (Gasteiger *et al.*, 2005). La predicción de la estructura secundaria se hizo a través de la herramienta Gor4 (Garnier, Gibrat, & Robson, 1996).

4.3. Modelamiento y análisis de la estructura terciaria de las proteínas.

La predicción de la estructura 3D de las proteínas se hizo por homología a través del servidor SwissModel del SwissProt (Bienert *et al.*, 2017; Guex, Peitsch, & Schwede, 2009; A. Waterhouse *et al.*, 2018), y por *threading* a través de la plataforma I-TASSER (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010; Yang *et al.*, 2014; Zhang, 2008).

La construcción de un modelo por homología en el servidor SwissModel ocurre en cuatro pasos, primero, se identifican las plantillas estructurales, luego se hace un alineamiento entre la secuencia problema y las estructuras de las plantillas, después se construye el modelo y finalmente se realiza la evaluación de la calidad. Cuando se completa la búsqueda de plantillas, se escoge un conjunto de máximo 50 plantillas de acuerdo a una puntuación simple que combina la cobertura y la similitud de secuencia. Las plantillas con mejor puntaje y los alineamientos se analizan de acuerdo con la calidad esperada de los modelos resultantes, estimada por los valores GMQE (*Global Model Quality Estimation*) y QMEAN (Bienert *et al.*, 2017; Guex *et al.*, 2009; A. Waterhouse *et al.*, 2018).

La puntuación GMQE resultante se expresa como un número entre 0 y 1, que refleja la precisión esperada de un modelo construido con ese alineamiento y plantilla y la cobertura del objetivo. Un valor cercano a 1 indica una mayor fiabilidad. Una vez que se construye un modelo, el valor GMQE se actualiza para este caso específico teniendo en cuenta también la puntuación QMEAN del modelo obtenido para aumentar la confiabilidad de la estimación de la calidad. QMEAN es un indicador

de calidad absoluta global (es decir, para toda la estructura) y local (es decir, por cada residuo). Este último puntaje, proporciona una estimación del “grado de *natividad*” de las estructuras observadas en el modelo a escala general. El valor de QMEAN indica si el modelo propuesto es comparable con lo que se esperaría de las estructuras experimentales (plantillas) de tamaño similar. Un valor QMEAN cercano a cero indica una buena concordancia entre la estructura del modelo y las estructuras experimentales de tamaño similar. Un valor negativo es un indicador de baja calidad del modelo (Bienert et al., 2017; Guex et al., 2009; A. Waterhouse et al., 2018).

Cuando no se logra una identidad de secuencia con la plantilla y la proteína que se quiere modelar de al menos el 30% se recurre al modelamiento por *threading*. El servidor I-TASSER identifica plantillas estructurales en la librería del *Protein Data Bank* (PDB) que tengan plegamientos similares, luego se toman fragmentos de las esas plantillas y se reensamblan para formar nuevos modelos completos en los que se tienen en cuenta aquellos modelos que resulten en estados de energía libre más baja (que serán los modelos más estables). En un tercer paso, se repite la simulación de ensamblaje de fragmentos, esta vez teniendo en cuenta las restricciones espaciales resultantes de los estados de mínima energía del paso previo, el propósito de esta segunda iteración es remover los impedimentos estéricos, así como refinar la topología global del alineamiento. El paso final es la optimización de la red de puentes de hidrógeno (Roy et al., 2010; Yang et al., 2014; Zhang, 2008).

Para predecir la función biológica de la proteína, el servidor I-TASSER compara los modelos 3D predichos con proteínas de tres bases de datos independientes que tengan una clasificación de enzima conocida (número EC), ontología de genes (GO) y sitios de unión a ligando. Los resultados finales de la predicción de funciones se reducen del consenso de las mejores predicciones con los puntajes de función calculados con base en el puntaje de confianza (C), de los modelos estructurales de I-TASSER, la similitud estructural entre el modelo y las plantillas evaluada por

el puntaje TM, y la identidad de la secuencia en las regiones estructuralmente alineadas (Roy et al., 2010; Yang et al., 2014; Zhang, 2008).

Los modelos predichos I-TASSER se clasifican de acuerdo con los valores de los puntajes C y TM. El puntaje C es el puntaje de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos, se encuentra en un rango $[-5,2]$, entre más alto el puntaje C, más confiable resulta el modelo. El puntaje TM es una escala para medir la similitud entre dos estructuras. Un puntaje $TM > 0.5$ indica un modelo con topología correcta, mientras que un puntaje < 0.17 indica una similitud aleatoria (Roy et al., 2010; Yang et al., 2014; Zhang, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización taxonómica

1.1. Caracterización Morfológica y Bioquímica.

A partir de dos especies de corales del Caribe colombiano, *Orbicella faveolata* y *Montastrea Caverosa* sanos y con enfermedad de Banda Negra, se obtuvieron un total de once aislamientos afiliados a la especie *Stappia indica*. Cuatro de *O. faveolata* enfermo de Banda Negra (CCBBBdOf-2, CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21), uno de *O. faveolata* sano (CCBhOf-14), y tres de cada *M. cavernosa* sano y enfermo de banda negra respectivamente (CCBhMc-3, CCBhMc-8, CCBhMc-7 y CCBBBdMc-3, CCBBBdMc-11, CCBBBdMc-12, respectivamente).

Los códigos de las cepas corresponden al tejido de coral a partir del cual fueron aisladas; para todas, **CCB**: cepas pertenecientes al grupo de investigación Comunicación y Comunidades Bacterianas; **h**, (*healthy*), muestra de coral sano; **BBd**, (*Black Band diseased*) coral enfermo de Banda Negra; **Of**, *Orbicella faveolata*; **Mc**, *Montastrea cavernosa*. Cada número corresponde al número del aislamiento.

Los aislamientos son bacilos Gram negativos, forman colonias de un tamaño de entre 2 y 3 milímetros de diámetro, de forma circular, bordes regulares con elevación en el centro y de color crema. Las 11 cepas bacterianas de estudio afiliadas a esta especie tuvieron un comportamiento fisiológico muy similar al reportado por Lai y colaboradores (2010), la mayoría de las cepas se caracterizaron por ser motiles, fueron capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono (excepto CCBBBdOf-5, CCBhOf-14 y CCBBBdMc-12) y de reducir nitratos (hasta nitrógeno elemental para el caso de CCBhMc-8; resultado color azul oscuro en la Tabla 6, página 61), ninguna degradó Urea ni produjo sulfuros (negativo en agar hierro tres azúcares (TSI), en Lisina Hierro Agar (LIA), y azufre-indol-motilidad

(SIM)) o Indol (medio SIM), así como ninguna degradó Tween 20 ni Tween 80 (Lai *et al.*, 2010).

El resultado de la prueba de oxidación y/o fermentación de glucosa, indicó que cuatro de los aislamientos utilizaron ambas rutas (CCBhMc-7, CCBBBdMc-11, CCBhMc-7 y CCBhMc-8), cuatro aislamientos utilizaron únicamente la ruta oxidativa (CCBBBdOf-9, CCBhOf-14, CCBBBdMc-3 y CCBhMc-3), un solo aislamiento utilizó únicamente la ruta fermentativa (CCBBBdMc-12) y dos aislamientos dieron resultados negativos para ambas pruebas (CCBBBdOf-5 y CCBBBdOf-21).

Además de las pruebas mencionadas anteriormente, complementando lo reportado por Lai y colaboradores (2010), se observó la capacidad de las cepas de estudio para producir ácido a partir de sustratos como lactosa (CCBBBdOf-2, CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-21 y CCBhMc-7) y sacarosa (excepto CCBBBdMc-3 y CCBBBdMc-11), hidrolizar proteínas como caseína en agar leche (excepto CCBBBdOf-2, CCBBBdMc-3 y CCBBBdMc-11), así como la capacidad de degradar la glucosa mediante un mecanismo oxidativo (excepto CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-21 y CCBBBdMc-12).

Los resultados de las pruebas bioquímicas se observan en la Tabla 5 (página 60) y se representan de manera gráfica en la matriz de presencia-ausencia de estos comportamientos en la Tabla 6 (página 61). La descarboxilación de lisina, el uso de glucosa mediante la ruta fermentativa y la fermentación de manitol, son pruebas negativas para los aislamientos obtenidos del coral *Orbicella faveolata* (sano y enfermo), mientras que dieron resultados positivos para los aislamientos obtenidos del coral *Montastrea cavernosa*, independientemente de su estado de salud.

En general, no se observa un patrón de respuesta metabólica que permita establecer asociaciones entre el estado de salud de los corales a partir de los que fueron aisladas las cepas de estudio y el comportamiento metabólico de las cepas bacterianas. La característica más evidente, es que las cepas tienen un

comportamiento de uso de sustratos variable, lo que podría significar que las bacterias afiliadas a esta especie poseen una alta capacidad de adaptarse a cambios drásticos en las condiciones que pueda presentar el medio que se encuentran colonizando.

Además del trabajo de Lai y colaboradores (2010), Wang y colaboradores (2010) mencionan la capacidad de cepas de *Stappia indica* de degradar de compuestos orgánicos de ambientes contaminados con mezclas de hidrocarburos. Por ejemplo, dos aislamientos obtenidos de aguas superficiales contaminadas con hidrocarburos de la isla de Xiamen, capaces de crecer en medios enriquecidos con *diesel* y petróleo (Lai et al., 2010; W. Wang et al., 2010).

Otro aspecto estudiado en otros trabajos es la capacidad moderadamente halotolerante de esta bacteria, al ser aislada en diferentes ocasiones de ambientes salinos, como por ejemplo tres cepas aisladas de un manantial salino de los Andes colombianos (C. Cárdenas & Baena, 2015), las cepas mencionadas anteriormente en el estudio de Wang y colaboradores (2010), y dos cepas aisladas de un medio de un consorcio de organismos degradadores del ion perclorato en medio de cultivo salino (Stepanov et al., 2014).

Este es el primer trabajo en el que, además de hacer una caracterización morfológica, bioquímica y molecular, se evalúan otras características fisiológicas como la capacidad de esta bacteria de crecer a diferentes temperaturas, salinidades y pH, así como la producción de moléculas de señalización del *Quorum Sensing* Acil-Homoserín-Lactonas. Todas estas características se discutirán más adelante.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos de estudio.

Estado de salud Coral	Corales enfermos							Corales sanos			
	O. faveolata	O. faveolata	O. faveolata	O. faveolata	M. cavernosa	M. cavernosa	M. cavernosa ^a	O. faveolata	M. cavernosa	M. cavernosa	M. cavernosa
Cepa→ Prueba↓ TSI	CCBBB dOf-2	CCBBB dOf-5	CCBBB dOf-9	CCBBB dOf-21	CCBBB dMc-3	CCBBB dMc-11	CCBB BdMc- 12	CCBhOf -14	CCBhM c-3	CCBhM c-8	CCBhMc -7
TSI	A/A	A/A	K/A	K/A	K/K	K/A	A/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Descarboxilación lisina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Desaminación Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación Glucosa	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Oxidación Glucosa	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citratos	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Reducción de NO ₃	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+ hasta N ₂	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lipasas Tween 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipasas Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formación de ácido de: Manitol	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactosa	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Hidrólisis de Caseína	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

K/A (Pico de color naranja y fondo amarillo)

A/A (Pico y fondo de color amarillo)

Tabla 6. Matriz de presencia/ausencia procesos metabólicos en las diferentes cepas de *Stappia indica*

		Cepas de <i>Stappia indica</i>										
		Corales enfermos						Corales sanos				
Prueba		1	2	3	4	6	7	8	5	9	10	11
Descarboxilación lisina												
Desaminación Lisina												
Ureasa												
Motilidad												
Producción de Indol												
Producción de H ₂ S												
Citratos												
Reducción de NO ₃												
Catalasa												
TSI Sacarosa												
TSI Lactosa												
TSI Glucosa												
Fermentación Glucosa												
Oxidación Glucosa												
Glucosa												
Lactosa												
Sacarosa												
Manitol												
Hidrólisis de Caseína												
Lipasas Tween 20												
Lipasas Tween 80												
pKR-C12												
pSB403												
W19												

Positivo	Positivo
Negativo	

1	CCBBBdOf-2
2	CCBBBdOf-5
3	CCBBBdOf-9
4	CCBBBdOf-21
5	CCBhOf-14
6	CCBBBdMc-3
7	CCBBBdMc-11
8	CCBBBdMc-12
9	CCBhMc-3
10	CCBhMc-8
11	CCBhMc-7

Las cepas se agruparon en dos grupos: corales enfermos (cepas 1 a 4 (*O. faveolata enfermo*) y 6 a 8 (*M. cavernosa enfermo*)) y corales sanos (Cepa 5 (*O. faveolata sano*) y cepas 9 a 11 (*M. cavernosa sano*)). Los colores indican un resultado negativo (amarillo) o positivo (azul celeste). En la prueba de reducción de nitratos, la cepa 10 (CCBhMc-8) tuvo un resultado más intenso, al llevar el nitrato hasta nitrógeno elemental, por esta razón, este resultado se representa con una tonalidad verde. Los resultados agrupados en el recuadro rojo corresponden a los ensayos de detección de la producción de moléculas de señalización del QS con biosensores bacterianos (resultados discutidos más adelante).

1.2. Clasificación taxonómica de las cepas.

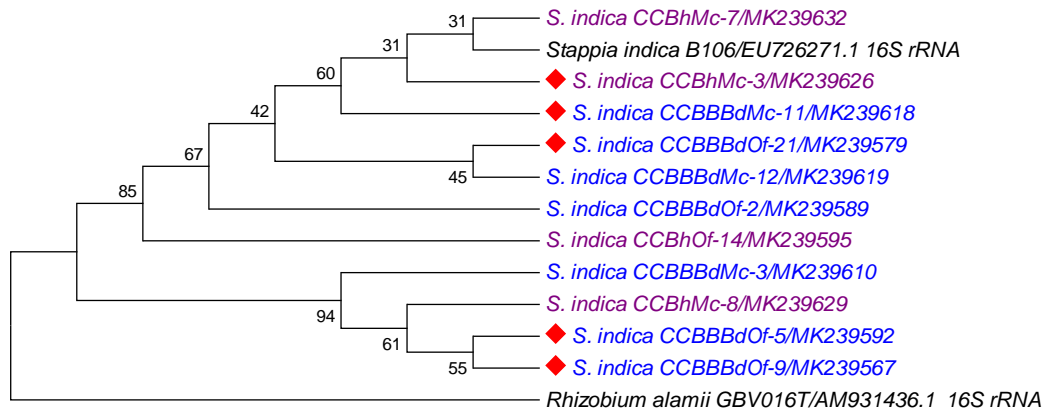
La caracterización molecular se hizo a través de la secuenciación del gen ribosomal ARNr 16S, los números de acceso al *GenBank* se encuentran enlistados en la Tabla 7 (página 62). Los aislamientos bacterianos se afiliaron a la especie *S. indica* B106 (*GenBank*: EU726271.1) con porcentajes de identidad de secuencia entre 97,92 y 99,92. A partir de los alineamientos múltiples, se calcularon las matrices de distancia basadas en los modelos evolutivos de Distancia P, Kimura-2 parámetros y *Maximum Likelihood* (Tabla 7, página 62), con las que finalmente, se construyeron dendrogramas con los métodos de agrupamiento *Neighbour Joining* utilizando la aproximación de *Maximum Composite Likelihood* (MCL) y *Maximum Likelihood* basado en el modelo de Tamura-Nei. Ambos dendrogramas fueron validados estadísticamente por el método *Bootstrap* con 1000 réplicas (Motoo Kimura, 1980; Saitou & Nei, 1987). Ver Figura 5, página 63.

Tabla 7. Identificación taxonómica de los once aislamientos asociados con *Stappia indica*.

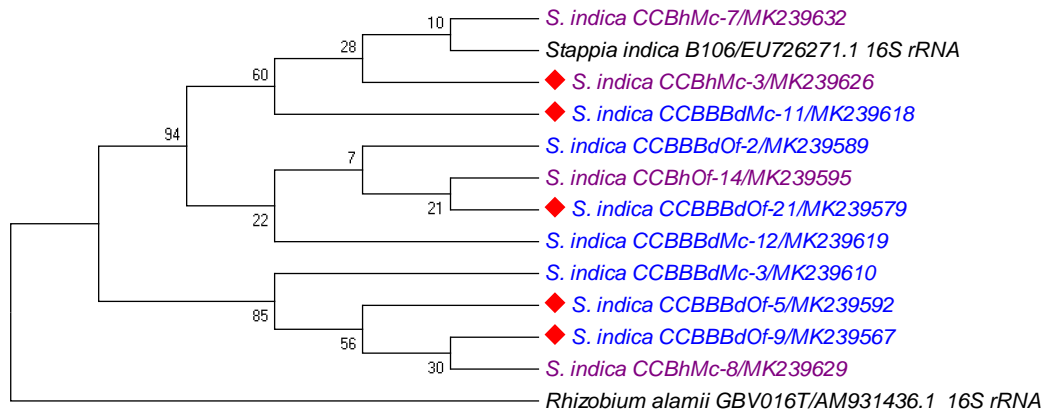
Cepa	Especie más similar	Número de Acceso en GenBank	% de identidad GenBank	1-distancia P	Kimura 2 parámetros	<i>Maximum Likelihood</i>
CCBBBdOf-2		MK239589	99,72	0,998	0,002	0,002
CCBBBdOf-5		MK239592	99,24	0,993	0,007	0,007
CCBBBdOf-9		MK239567	99,24	0,992	0,008	0,008
CCBBBdOf-21		MK239579	99,72	0,998	0,002	0,002
CCBhOf-14	<i>Stappia indica</i> B106	MK239595	97,92	0,978	0,022	0,022
CCBBBdMc-3		MK239610	98,5	0,991	0,009	0,009
CCBBBdMc-11		MK239618	99,25	0,995	0,005	0,005
CCBBBdMc-12		MK239619	99,67	0,998	0,002	0,002
CCBhMc-3		MK239626	99,33	0,994	0,006	0,006
CCBhMc-7		MK239632	99,92	0,999	0,001	0,001
CCBhMc-8		MK239629	98,75	0,993	0,007	0,007

Figura 5. Clasificación de los aislamientos bacterianos identificados como *Stappia indica*.

A



B



- A)** Dendrograma construido utilizando el método de agrupamiento *Neighbour Joining*. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 0.09753000. El porcentaje de árboles replicados en los cuales los taxones se agruparon en la prueba *Bootstrap* (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de distancia P y están en las unidades de diferencia de número de bases por sitio. El análisis involucró 13 secuencias de nucleótidos.
- B)** Dendrograma inferido usando el método de Probabilidad Máxima basado en el modelo Tamura-Nei. Se muestra el árbol con el logaritmo de la probabilidad más alto (-1949.4525). El porcentaje de árboles en el cual los taxones asociados se agruparon está junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda aproximada fueron obtenidos automáticamente aplicando el algoritmo *Neighbour Joining* a una matriz distancias apareadas estimada usando la aproximación de *Maximum Composite Likelihood* (MCL) y seleccionando entonces la topología con el valor más alto en el logaritmo de la probabilidad.

Para ambos dendrogramas, las cepas en color **púrpura** provienen de los corales sanos, las cepas en color **azul** provienen de los corales enfermos, las cepas en color **negro** son la cepa de referencia *S. indica* B106 y el grupo externo *Rhizobium alarii* GVB016T. Los diamantes rojos () representan las cepas que dieron positivo a las pruebas de detección de moléculas señal del *Quorum Sensing*, Acil Homoserín Lactonas.

Los Dendrogramas (Figura 5 A y B, página 63), fueron construidos a partir de los valores de las matrices de distancia calculadas para el alineamiento múltiple de las secuencias consenso del gen de ADN ribosomal 16S de las cepas analizadas en este trabajo, la cepa de referencia de *Stappia indica* B106T (*GenBank*: EU726271.1) y el grupo externo *Rhizobium alarii* GBV016T (*GenBank*: AM931436.1). El grupo externo fue elegido por pertenecer a la misma clase (alfa proteobacterias), pero distinto orden, tiene una relación filogenética cercana a *R. leguminosarum* (AY509899), que fue una de las especies de referencia empleadas en la clasificación taxonómica del género *Stappia* (Weber & King, 2007).

El dendrograma A, construido con el método de agrupamiento *Neighbour-Joining*, se divide en dos grupos principales, excepto por la cepa CCBhOf-14 que se agrupa de forma más distante con respecto a las demás secuencias, porque posee el porcentaje de similitud más bajo con la secuencia de referencia B106 y en consecuencia el valor de distancia P más lejano a 1 (97,92% y 0,978 respectivamente). A pesar de presentar los mismos valores de distancia p y de porcentaje de similitud, las cepas CCBBBdOf-2 y CCBBBdOf-21 se agruparon en distintos clados (0,998 y 99,72% respectivamente). El dendrograma B, construido con el método de agrupamiento *Maximum Likelihood*, también se divide en dos grupos principales, en este caso CCBhOf-14 no se separa de forma tan drástica del resto de las secuencias comparadas, sino que se incorpora a un mismo clado, junto con CCBBBdOf-2 y CCBBBdOf-21.

En ambos gráficos, CCBhMc-7, que fue la cepa más similar con B106 (99,92%), se agrupó con la cepa de referencia, mientras que las cepas CCBBBdMc-3, CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9 y CCBhMc-8 forman el grupo más pequeño, que se separa del resto de las secuencias comparadas.

No se encontró ninguna relación aparente entre el comportamiento metabólico de las cepas de estudio y la forma en que se agruparon en ninguno de los dendrogramas. Sin embargo, teniendo en cuenta las características mencionadas por diferentes autores sobre el potencial de degradación de hidrocarburos y la

afinidad por ambientes salinos, sería interesante, en futuros trabajos, aplicar más pruebas encaminadas a evaluar estos comportamientos en estas cepas de *S. indica*. Por ejemplo, evaluar si pueden crecer en medios de cultivo enriquecidos con distintas fuentes de carbono como dióxido de carbono, metano, metanol, metilamina, dimetil éter, dimetil carbonato, dimetil sulfóxido etc., y determinar así si *S. indica* se puede clasificar entre metilótrofa, metanótrofa y/o carboxidótrofa. Esto permitiría también explorar su potencial biotecnológico, que, dada la habilidad de adaptación ya mencionada, podría ser útil para diferentes propósitos.

2. Condiciones óptimas de crecimiento de los aislamientos identificados como *Stappia indica*.

Por medio de mediciones espectrofotométricas de la densidad óptica de los cultivos, se hizo seguimiento del crecimiento de cinco de los once aislamientos, para cada uno de los factores fisicoquímicos a los que fueron sometidas por 72 horas en intervalos de medición de 12 horas. Con los datos registrados en cada medición se construyeron curvas que mostraban el crecimiento de cada una de las bacterias ante las diferentes variaciones tales condiciones en función del tiempo.

Los datos obtenidos en estos ensayos se resumen en la Tabla 8 , página 66, que muestra los valores óptimos de crecimiento para cada bacteria, en cada uno de los factores, en dos categorías: la categoría A, que indica el valor del factor fisicoquímico analizado en el que la bacteria alcanza el máximo de biomasa sin importar el tiempo y la categoría B que indica el punto del factor fisicoquímico analizado en el que la bacteria alcanza el máximo de biomasa en el menor tiempo.

Teniendo en cuenta que el QS es un mecanismo de comunicación que depende de la densidad poblacional, conocer las condiciones óptimas de crecimiento y el tiempo que le toma a las cepas de *S. indica* alcanzar la fase estacionaria, es importante para determinar el momento en que la densidad celular es más alta, ya que, en esta fase, se da la autoinducción de la sintasa tipo LuxI y la producción de

moléculas señal del QS alcanza su concentración máxima (Osorno et al., 2011; Shaw et al., 1997; J. Wang et al., 2011).

Tabla 8. Condiciones fisicoquímicas evaluadas.

Aislamiento	Temperatura (°C)	Salinidad (%) A	Salinidad (%) B	pH A	pH B
CCBBBdOf-5	15	0,5	1	7	7
CCBBBdOf-9	15	0,5	0,5	7	7
CCBBBdOf-21	37	0,5	1	8	8
CCBBBdMc-11	15	0,5	0,5	8	8
CCBhMc-3	37	0,5	11	8	7

Temperatura, Salinidad y pH óptimos para la obtención del máximo de biomasa bacteriana para cada uno de los aislamientos.

Salinidad **A**: Máximo de biomasa obtenido; Salinidad **B**: Máximo de biomasa obtenido en el menor tiempo.

2.1. Temperatura, salinidad y pH óptimos de crecimiento para cada aislamiento.

Para el caso de la temperatura, los valores óptimos de crecimiento oscilaron entre los 15°C y 37°C, no se tuvo ningún registro de crecimientos óptimos a 4 y 9°C. Los valores óptimos de crecimiento para la salinidad tanto en la categoría A como en la B oscilaron entre 0,5% y 1%, sin embargo, en este factor se encontró que la bacteria CCBhMc-3 mostró un punto óptimo de crecimiento (perteneciente a la categoría B: máximo de biomasa en menor tiempo) bastante diferente a los registrados para las demás bacterias igual al 11%. Por último, los valores óptimos de crecimiento para todas las bacterias en las dos categorías en el factor pH oscilaron entre 7 y 8. Como ejemplo, mostramos los resultados obtenidos para la cepa CCBhMc-3 en la Figura 6 (página 68).

La medición de las condiciones fisicoquímicas óptimas de crecimiento puede ser empleada para evaluar la respuesta de las bacterias a los factores ambientales que tengan una influencia en su proliferación. Estos factores, en un ambiente natural, tienen un efecto directo en la disponibilidad y en el flujo de nutrientes entre las

células bacterianas y el medio que las rodea (Or, Smets, Wraith, Dechesne, & Friedman, 2007).

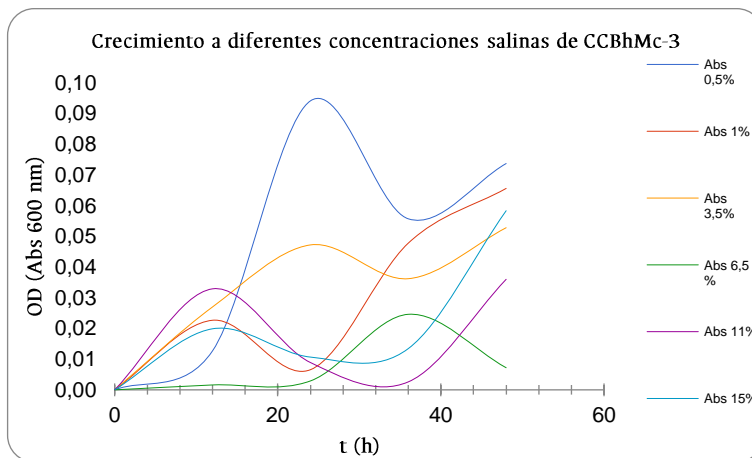
El crecimiento de las cepas de *Stappia indica* se vio mayormente afectado por las variaciones de temperatura y salinidad. El principal efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las bacterias es fisiológico, por la alteración de las funciones internas, debido a que las reacciones metabólicas bacterianas están mediadas por enzimas. A temperaturas óptimas, la actividad de las enzimas, y por ende el crecimiento bacteriano se verán afectados positivamente (Manahan, 2000; Pommerville, 2014). La temperatura también afecta el periodo de adaptación y esto se observa al evaluar el crecimiento en función del tiempo (Or et al., 2007). En la Figura 6 (página 68), en la gráfica de temperatura para la cepa CCBhMc-3, se observa que, los períodos de adaptación más cortos ocurrieron a temperaturas de 15 y 28°C; a 37°C, es la temperatura a la cual el periodo de adaptación de la cepa es más largo, aunque es la temperatura a la que se obtiene mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo. Este es un fenómeno que se observó en las cinco cepas evaluadas.

En lo referente a la salinidad, el crecimiento de las bacterias se puede ver reducido, a medida que aumenta la concentración de cloruro de sodio en el medio, esto puede deberse a un aumento en la presión osmótica del sistema, que obliga a las bacterias a reducir su tasa de replicación (Or et al., 2007). De acuerdo con lo reportado por Kim & Gadd, las diferentes cepas de *S. indica* mostraron mejores tasas de crecimiento a valores de pH de 7 y 8; seguido por el crecimiento cuando el pH del medio de cultivo era 9. Cuando el medio se ajustó a condiciones ácidas (pH 4.5 y 5.5), la tasa de crecimiento de todas las cepas evaluadas se vio disminuida.

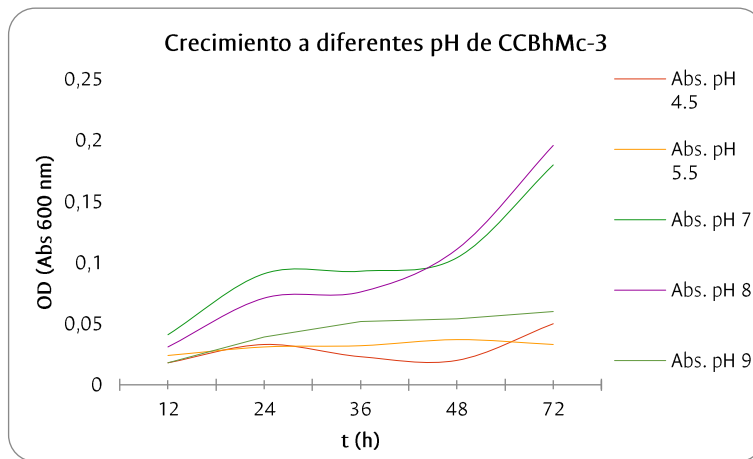
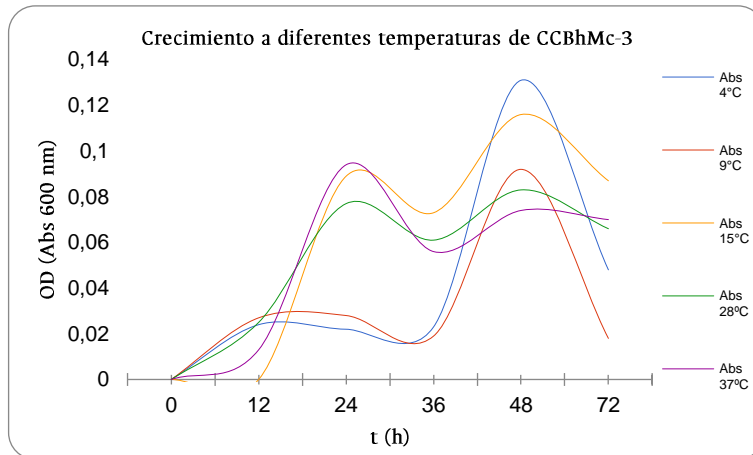
Toda la información que se pueda saber de estos factores, que influyen en la adaptación de bacterias propias de la microbiota de organismos marinos, es fundamental para conocer los efectos en la biodiversidad que pueden tener las

variaciones ocasionadas por cambios drásticos en los ecosistemas, ya sea por derrames de petróleo, desagües de aguas negras y en general el cambio climático.

Figura 6. Condiciones fisicoquímicas de crecimiento óptimo para *S. indica* CCBhMc-3



Densidades ópticas obtenidas para el crecimiento a diferentes temperaturas, concentraciones salinas (NaCl) y pH del aislamiento Stappia indica CCBhMc-3.

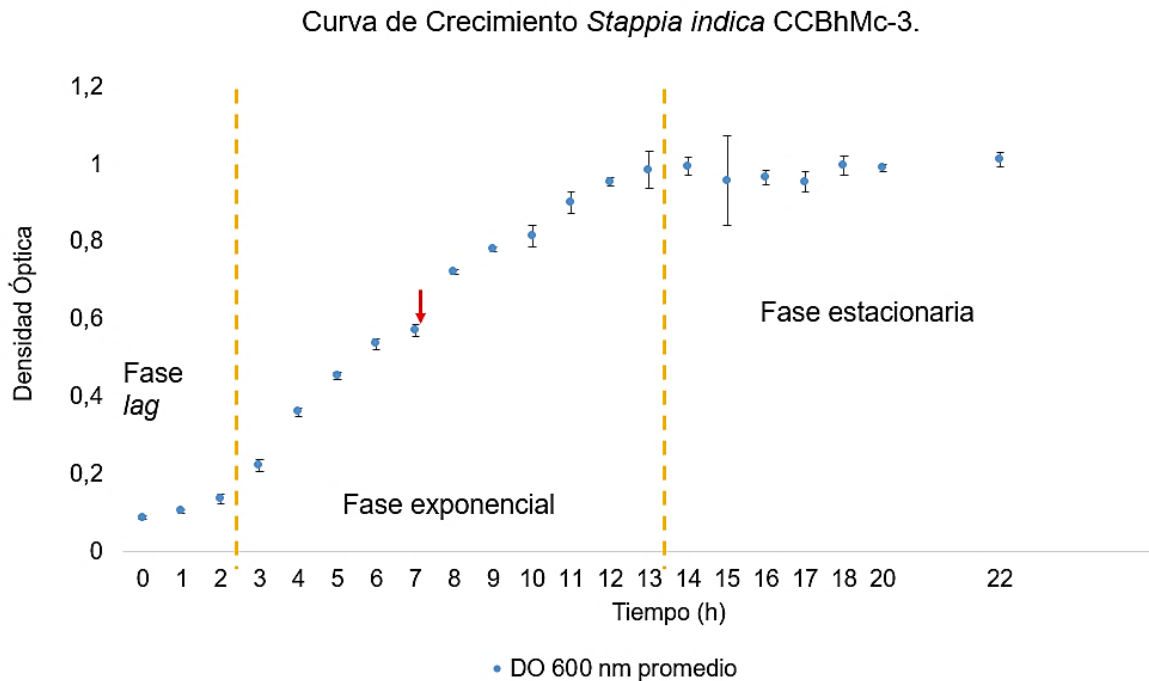


2.2. Curvas de crecimiento de diferentes cepas identificadas como *Stappia indica*.

Una vez determinadas las condiciones fisicoquímicas óptimas de crecimiento de las bacterias de este estudio, y con el fin de conocer el tiempo que requería cada aislamiento para alcanzar la fase estacionaria, se llevó a cabo la evaluación del crecimiento de las cepas en función del tiempo en un medio de cultivo de composición conocida con las condiciones fisicoquímicas de crecimiento óptimas ajustadas (se tomaron 25 mL de preinóculo de cada aislamiento y se llevaron hasta un volumen final de 250 mL, el pH se ajustó en 7, la concentración (% p/v) de NaCl fue de 0,5, la temperatura de incubación se mantuvo constante a 37°C, así como la agitación (200 rpm)) y se hicieron mediciones de la densidad óptica cada hora a

600 y 595 nm. Por último, se construyeron las gráficas de la densidad óptica promedio en función del tiempo y se tuvieron en cuenta la desviación estándar en cada punto, así como el coeficiente de variación.

Figura 7. Curva de crecimiento de *S. indica* CCBhMc-3.



Las líneas punteadas amarillas delimitan las diferentes etapas de crecimiento: fase lag o de adaptación, la fase exponencial y la fase estacionaria. La flecha roja indica el punto medio de la fase exponencial. La densidad óptica es la Absorbancia medida a 600 nm.

La Figura 7 (página 70), corresponde a la curva de crecimiento obtenida para la cepa CCBhMc-3. La fase lag, o de adaptación de todos los aislamientos duró en promedio cinco horas, luego, las cepas entraron en fase exponencial y continuaron su crecimiento durante 14 horas, después de este tiempo entraron en fase estacionaria. Aunque en algunas cepas se podría ver evidencia de un crecimiento diaúxico, este no fue evaluado específicamente para los intereses del presente estudio.

Teniendo conocimiento de las condiciones óptimas de crecimiento y el tiempo que le toma a estas bacterias alcanzar la fase estacionaria, se prepararon las extracciones de las moléculas de señalización del *Quorum Sensing* Acil-Homoserín Lactonas que, como ya se mencionó, dada la auto inducción intrínseca de la

regulación por QS, pueden ser obtenidas en mayor concentración entre la mitad de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria, cuando la densidad poblacional es alta (Cha et al., 1998; Cuadrado-Silva et al., 2013; Osorno et al., 2011; Shaw et al., 1997; J. Wang et al., 2011).

3. Detección de moléculas de señalización

Con el uso de los biosensores detallados en la Tabla 2 (página 48), se determinó la capacidad de cada uno de los aislamientos bacterianos de producir moléculas de señalización del *Quorum Sensing* similares a las N-Acil Homoserín Lactonas. Los resultados de los co-cultivos realizados entre las bacterias problema y los biosensores se muestran a continuación en las Figura 8 y Figura 9, (páginas 73 y 75). En la Figura 8, se observa la inducción de la expresión de la proteína verde fluorescente por parte de los biosensores pKR-C12 y W19, inducida por las bacterias problema. También se puede ver la inducción de bioluminiscencia sobre el biosensor pSB403 por parte de las bacterias problema en los ensayos de siembra en T, en la Figura 9 se observan resultados similares, con halos de inducción de la expresión en los genes reporteros de los biosensores.

Cinco de las once cepas de *Stappia indica* indujeron la expresión de los fenotipos reporteros de los biosensores bacterianos específicos para Acil-Homoserín Lactonas. Las cepas que presentaron este comportamiento provenían mayoritariamente de las muestras de corales *Orbicella faveolata* (CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9 y CCBBBdOf-21) y *Montastrea cavernosa* (CCBBBdMc-11) enfermos de Banda Negra, mientras que sólo una cepa de las obtenidas de los corales sanos indujo a los biosensores: la cepa CCBhMc-3 del coral *M. cavernosa*.

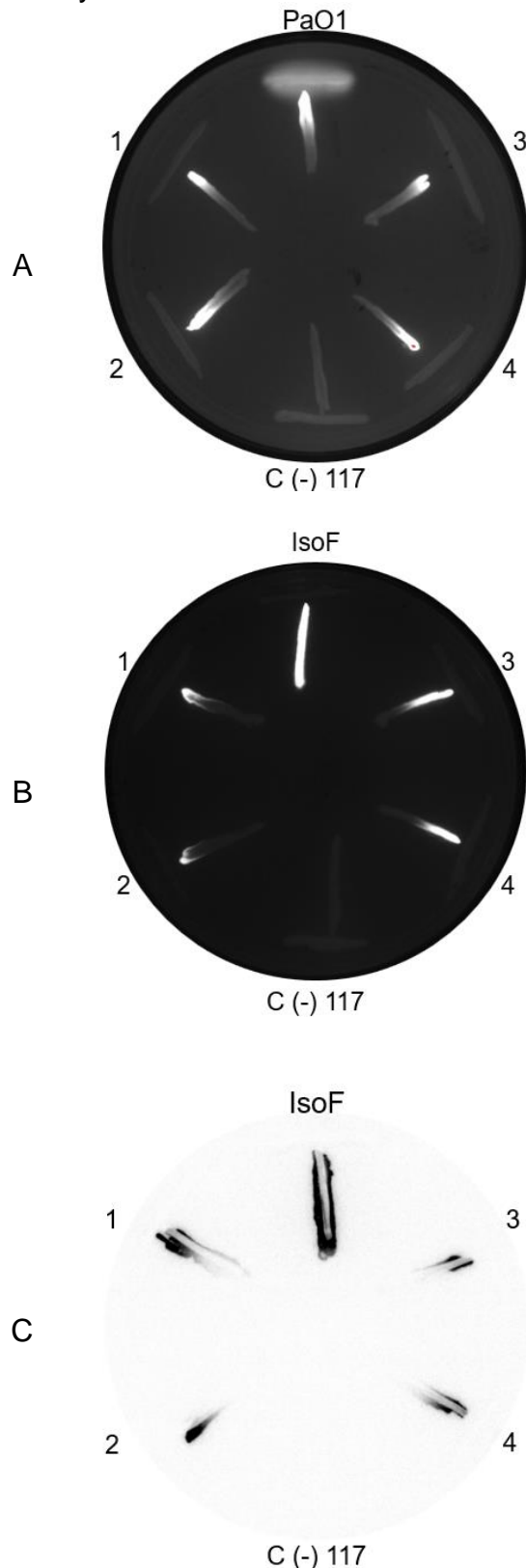
Se detectaron las moléculas señal AHLs producidas por las cinco cepas mencionadas anteriormente por los tres biosensores pKR-C12, W19 y pSB403 como se ilustra en la Figura 8 (página 73) y la Figura 9 (página 75). La inducción en el fenotipo reportero (*gfp*) de pKR-C12 (Figuras 8 y 9 A) y de W19 (Figuras 8 y 9 B) indica la producción de 3-oxo-C12 y/o 3-oxo-C10-AHLs; la bioluminiscencia

del biosensor pSB403 muestra la presencia de C6- y/o C8-AHLs (Figuras 8 y 9 C). Estos resultados indican que la concentración a la que se produjeron las AHLs se encuentra, tentativamente, en un rango de 10 a 50 nM, concentración necesaria para inducir fenotipos como la producción de *gfp* en *Pseudomonas putida* y la bioluminiscencia en cepas como *Vibrio fischeri* (Fekete, Kuttler, et al., 2010; Whitehead et al., 2001).

Este trabajo es el primer reporte de la producción de un espectro variado de moléculas de señalización del *Quorum Sensing* Acil-Homoserín-Lactonas por parte de la bacteria *Stappia indica*, lo que significa que esta bacteria está relacionada con eventos de comunicación bacteriana mediados por estas moléculas y que la comunicación puede ser intra e interespecífica, es decir que *S. indica* podría modular comportamientos de grupo con miembros de su misma especie, así como con otras bacterias de otros grupos taxonómicos que sean capaces de detectar sus señales.

Como se mencionó anteriormente, hasta el momento no se había reportado que *S. indica* se encontrara involucrada en eventos de comunicación bacteriana regulados por QS; sin embargo se había reportado previamente que una especie bacteriana del mismo género *Stappia alba*, posee la capacidad de degradar un amplio rango de AHLs entre las que se encuentran C6-AHL (N-(3-hexanoil)-L-Homoserín Lactona), 3-oxo-C6-AHL (N-(3-oxohexanoil)-L-Homoserín Lactona) y la 3-OH-C6-AHL (N-(3-hidroxihexanoil)-L-Homoserín Lactona) (Ghani, Norizan, Chan, Yin, & Chan, 2014).

Figura 8. Detección de la producción de moléculas de señalización tipo AHLs. Ensayo de Siembra en T.



A) Producción de la proteína verde fluorescente (*gfp*) del biosensor pKR-C12 (estrías internas, perpendiculares al borde de la caja 'brillantes') inducida en presencia de AHLs exógenas similares a 3-oxo-C12- y/o 3-oxo-C10-AHLs, producidas por las cepas de *S. indica* y el control positivo *P. aeruginosa* PAO1. La estría del biosensor enfrentada al control negativo *P. putida* IsoF 117 no expresa el fenotipo reportero debido a que 117 no produce AHLs.

B). La producción de *gfp* de la cepa biosensora *E. coli* W19 C12 (estrías internas, perpendiculares al borde de la caja 'brillantes') inducida en presencia de AHLs exógenas similares a 3-oxo-C12-AHL, producidas por las cepas de *S. indica* y el control positivo *P. putida* IsoF. La estría del biosensor enfrentada al control negativo *P. putida* IsoF 117 no expresa el fenotipo reportero debido a que 117 no produce AHLs.

C) Bioluminiscencia producida por el biosensor *E. coli* pSB403 (estrías internas negras, perpendiculares al borde de la caja) inducida en presencia de AHLs exógenas similares a C6-, C8-, C10-, y/o C12-AHLs, producidas por las cepas de *S. indica* y el control positivo *P. putida* IsoF. La estría del biosensor enfrentada al control negativo *P. putida* IsoF 117 no expresa el fenotipo reportero debido a que 117 no produce AHLs.

Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 fueron tomadas usando el digitalizador de imágenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad.

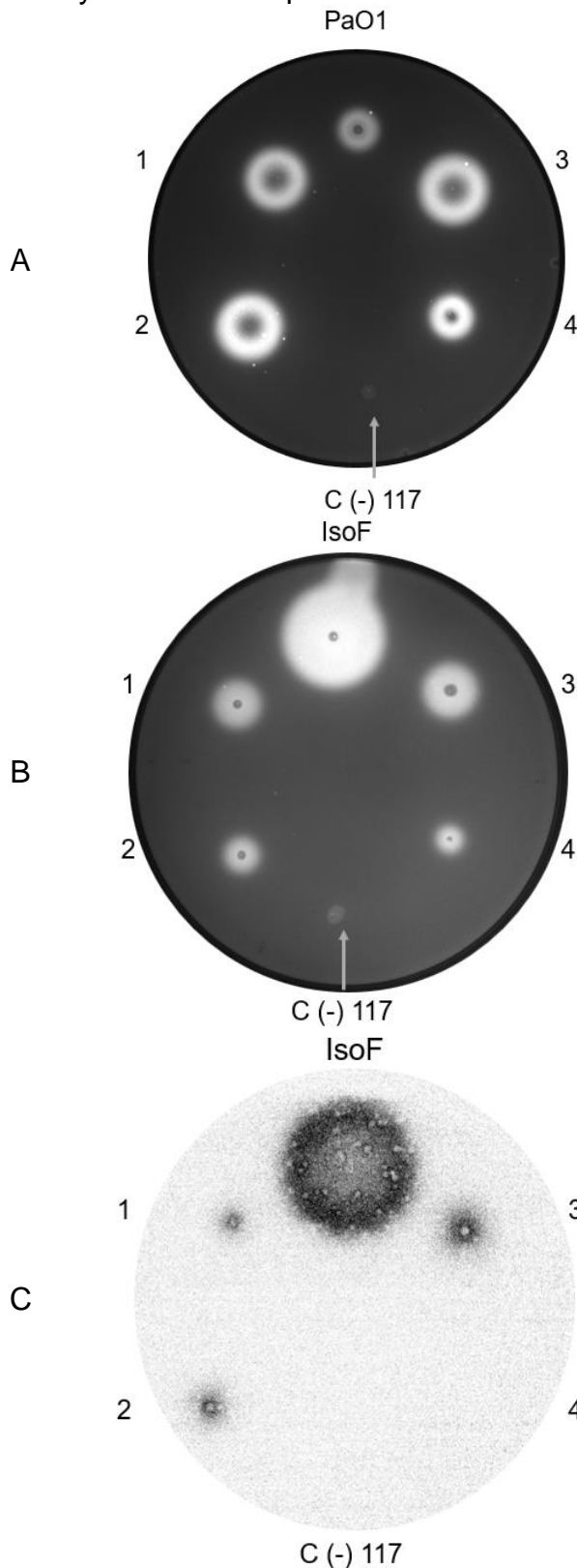
La producción de *gfp* fue observada en el mismo digitalizador de imágenes con un filtro UV XcitaBlue™ 1708182.

Para todos los casos:

1. CCBBBdOf-5
2. CCBBBdOf-9
3. CCBBBdOf-21
4. CCBhMc-3

La cepa CCBBBdMc-11 Fue evaluada en otro grupo, los resultados fueron positivos para los tres biosensores.

Figura 9. Detección de la producción de moléculas de señalización tipo AHLs. Ensayo Siembra en punto.



A) Producción de la proteína verde fluorescente (*gfp*) del biosensor pKR-C12 (halos brillantes) inducida en presencia de AHLs exógenas similares a 3-oxo-C12- y/o 3-oxo-C10-AHLs, producidas por las cepas de *S. indica* y el control positivo *P. aeruginosa* PAO1. La estría del biosensor enfrentada al control negativo *P. putida* IsoF 117 no expresa el fenotipo reportero debido a que 117 no produce AHLs.

B). La producción de *gfp* de la cepa biosensora *E. coli* W19 C12 (halos brillantes) inducida en presencia de AHLs exógenas similares a 3-oxo-C12-AHL, producidas por las cepas de *S. indica* y el control positivo *P. putida* IsoF. La estría del biosensor enfrentada al control negativo *P. putida* IsoF 117 no expresa el fenotipo reportero debido a que 117 no produce AHLs.

C) Bioluminiscencia producida por el biosensor *E. coli* pSB403 (halos oscuros) inducida en presencia de AHLs exógenas similares a C6-, C8-C10-, y/o C12-AHLs, producidas por las cepas de *S. indica* y el control positivo *P. putida* IsoF. La estría del biosensor enfrentada al control negativo *P. putida* IsoF 117 no expresa el fenotipo reportero debido a que 117 no produce AHLs.

Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 fueron tomadas usando el digitalizador de imágenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad.

La producción de *gfp* fue observada en el mismo digitalizador de imágenes con un filtro UV XcitaBlue™ 1708182.

Para todos los casos:

1. CCBBBdOf-5
2. CCBBBdOf-9
3. CCBBBdOf-21
4. CCBhMc-3

La cepa CCBBBdMc-11 Fue evaluada en otro grupo, los resultados fueron positivos para los tres biosensores.

3.1. Caracterización de las moléculas señal de Quorum Sensing tipo AHLs por técnicas cromatográficas

Una vez se realizó el proceso de extracción de las moléculas producidas por cada una de las cepas de interés, era necesario saber si dichos extractos tenían actividad, induciendo a los biosensores mediante la presencia de las AHLs. Con este fin se realizaron bioensayos en los que se impregnaron discos estériles de papel filtro con 10 µl de extracto crudo de cada una de las bacterias y se enfrentaron con el biosensor pSB403 y un control negativo (cepa IsoF117). Los resultados obtenidos a partir de la visualización de cada una de las pruebas, confirma la presencia de al menos un tipo de AHL en cada uno de los extractos obtenidos y demostraron que la concentración de estas moléculas de señalización es suficiente para ser detectada por los biosensores en ensayos de co-cultivo y en cromatografía de capa delgada. Los resultados de este bioensayo se pueden observar en la Tabla 9 (página 77).

3.1.1. Cromatografía en Capa Delgada de los extractos crudos de las cepas de *S. indica*

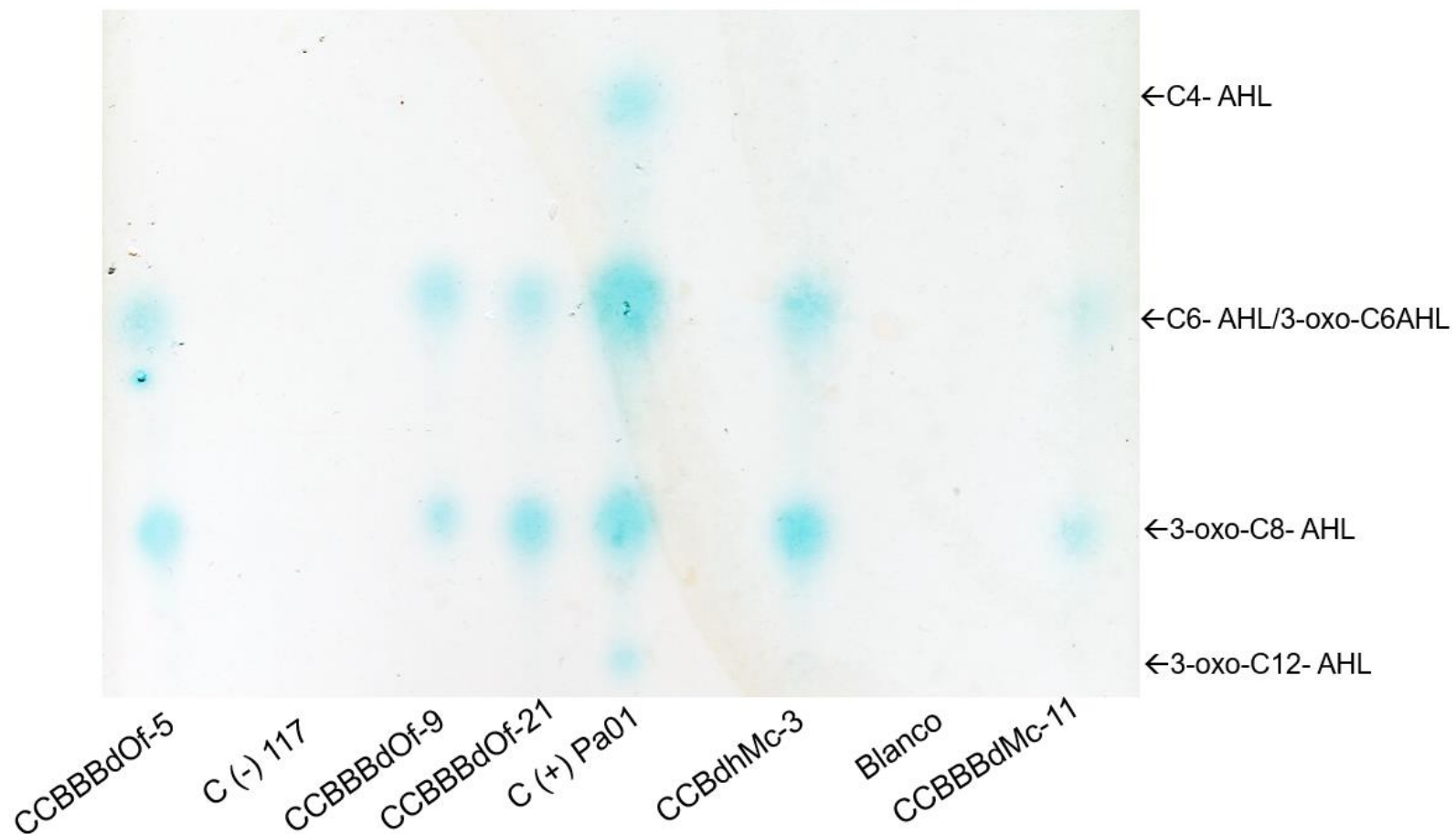
La caracterización cualitativa de las moléculas de señalización Acil-Homoserín Lactonas producidas por *Stappia indica* se hizo por Cromatografía en Capa Delgada. Como se observa en la Figura 10 (página 78), el patrón de migración de las moléculas señal tipo AHL producidas por las bacterias problema y reveladas con el biosensor *A. tumefaciens* pZLR4, es similar al patrón de migración de las moléculas señal AHLs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en dos puntos. Considerando que el perfil cromatográfico de las AHLs producidas por PAO1 se encuentra bien caracterizado (Geisenberger *et al.*, 2000), y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la detección de este tipo de moléculas con el biosensor pSB403, es posible sugerir que las moléculas de señalización producidas por las bacterias son similares a las AHLs de 6 y 8 carbonos en su cadena acilada, similares a las 3-oxo-C6 AHL y C8-AHL de PAO1.

Tabla 9. Resultados bioensayos con el biosensor pSB403.

Montaje inicial	PAO1 (C+)	117 (C-)
Blanco	CCBBBdOf-5	CCBBBdOf-9
CCBBBdOf-21	CCBBBdMc-11	CCBhMc-3

Inducción en la producción de bioluminiscencia del biosensor *E. coli* pSB403 por AHLs presentes en los extractos crudos de: el control positivo *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21 y CCBBBdMc-11. Las cepas CCBBBdOf-5 y CCBhMc-3 dieron un resultado positivo débil. Como era de esperarse, ni extracto del blanco ni el del control negativo (IsoF117) indujeron la expresión del fenotipo reportero del biosensor. Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 fueron tomadas usando el digitalizador de imágenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad.

Figura 10. CCD de los extractos crudos obtenidos de aislamientos de *S. indica*.



La fase estacionaria fue gel de sílice RP-18, la fase móvil fue metanol:agua (60:40). La Cromatografía se reveló empleando el biosensor bacteriano *Agrobacterium tumefaciens* pZLR4, y usando X-gal como indicador. Los resultados indican que la producción de moléculas señal del QS son similares a la C6 y C8-AHL.

Los resultados obtenidos de los ensayos de detección de moléculas señal y la evaluación cualitativa de las AHLs por CCD permiten afirmar que las cinco cepas de *S. indica* aquí estudiadas producen AHLs que se diferencian tanto en la longitud de su cadena acilada como en la posible sustitución del carbono 3. Como se mencionó en los numerales 1.4.1.1 (página 29) a 1.4.1.4 (página 31), las diferencias en la intensidad de la expresión de los fenotipos reporteros de los biosensores pueden obedecer a la afinidad que presentan los sistemas receptores por las moléculas señal. Por ejemplo, el biosensor pZLR4 está construido a partir del circuito de QS Tral/TraR de *Agrobacterium tumefaciens*, puede detectar diferentes moléculas señal, pero no puede producirlas. En su estado silvestre, *A. tumefaciens* produce y detecta principalmente la 3-oxo-C8-AHL, por lo que éste será el ligando que al unirse a la proteína TraR, generará la máxima actividad de la enzima.

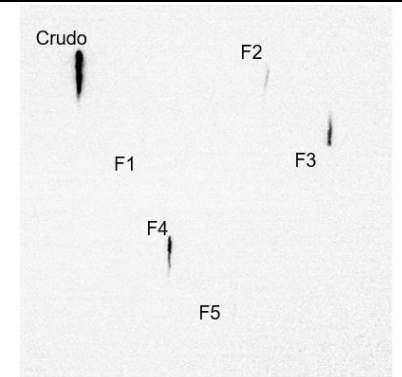
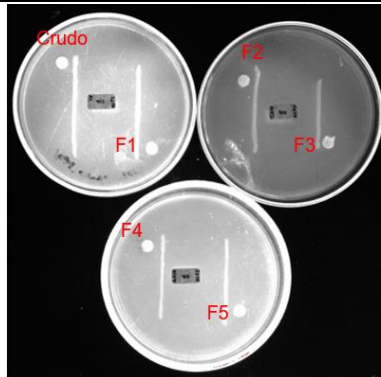
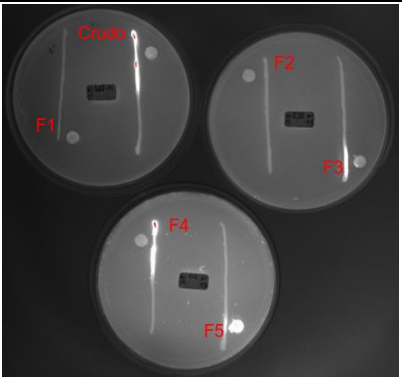
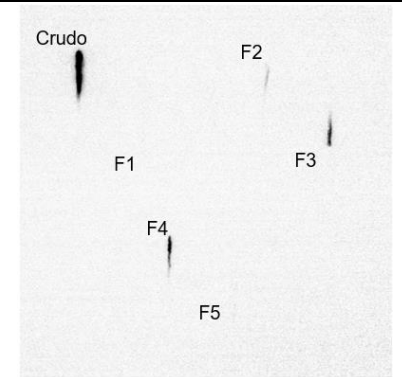
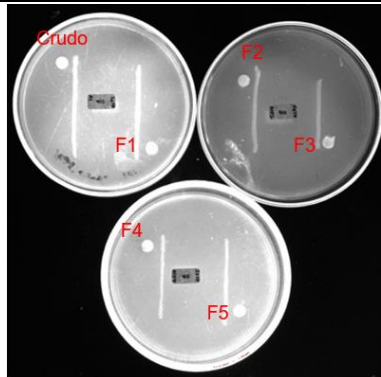
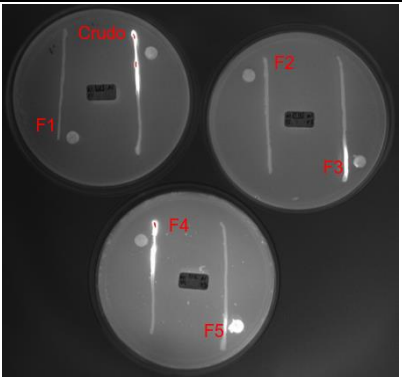
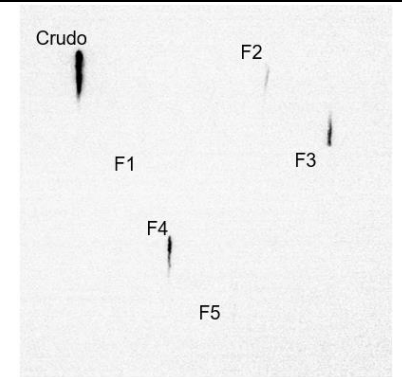
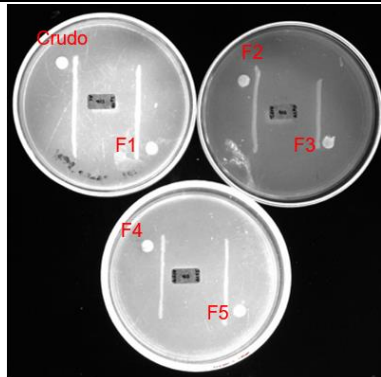
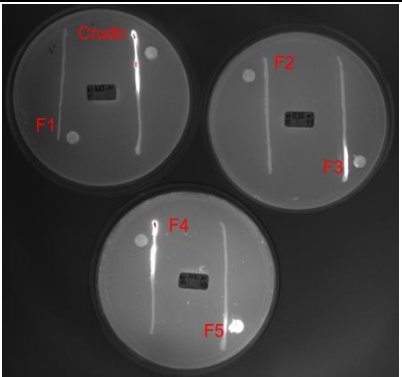
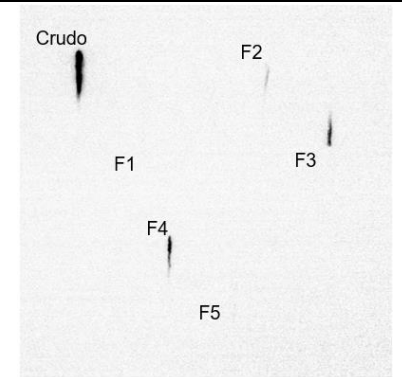
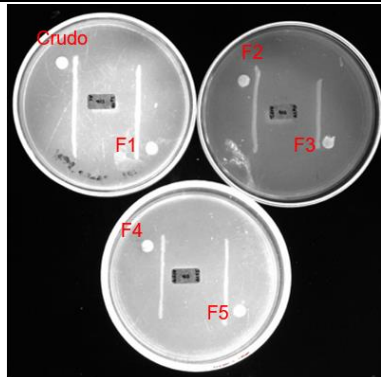
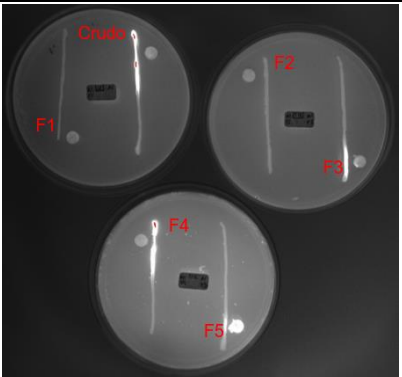
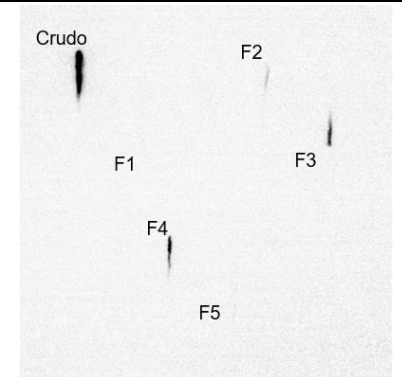
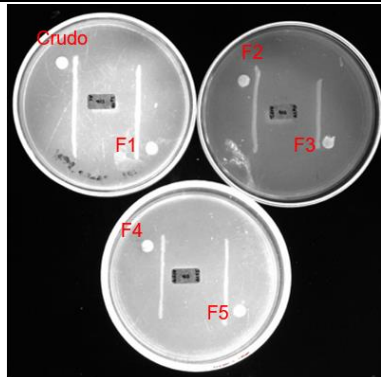
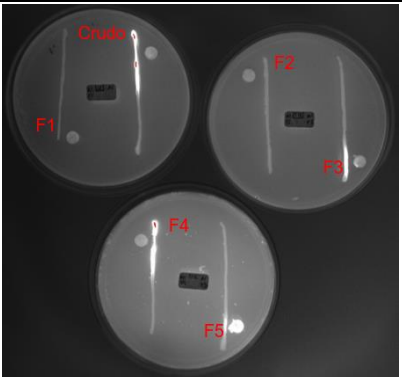
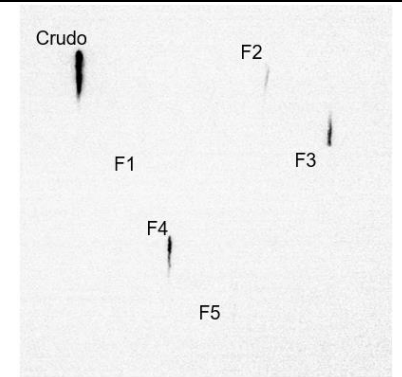
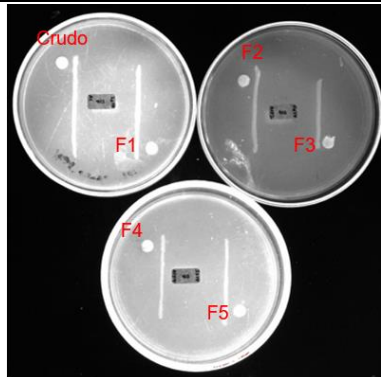
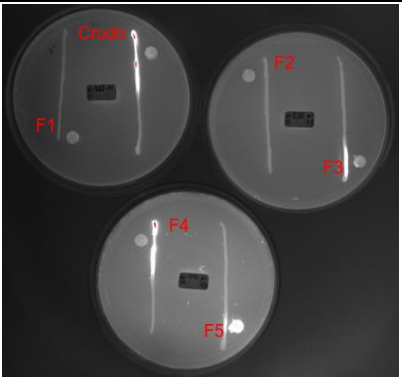
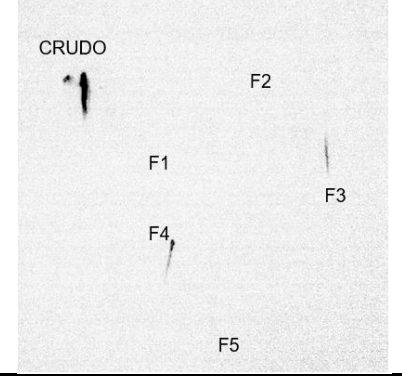
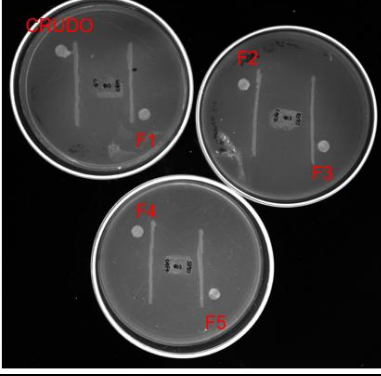
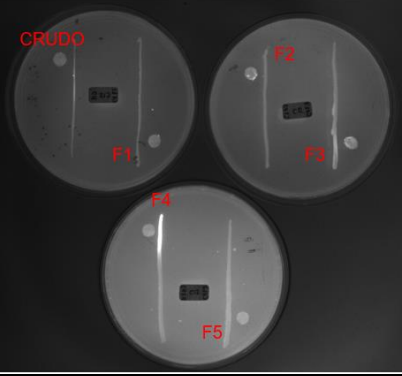
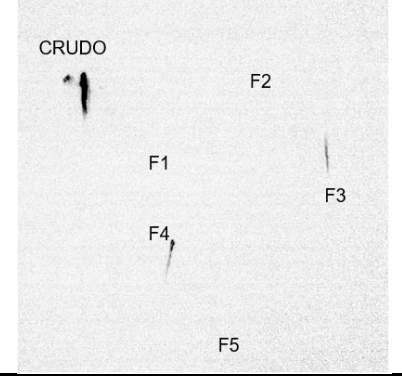
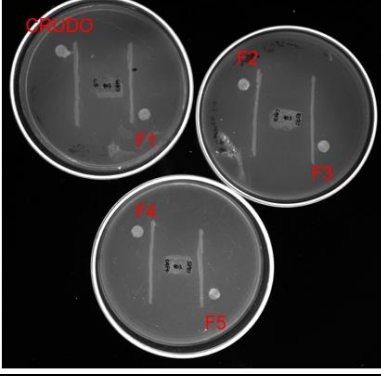
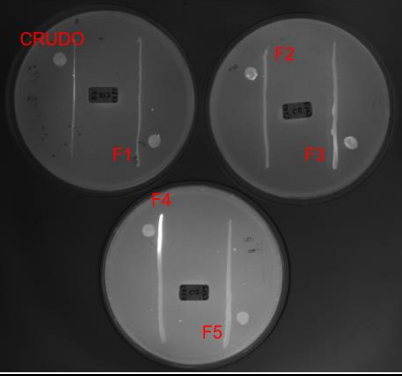
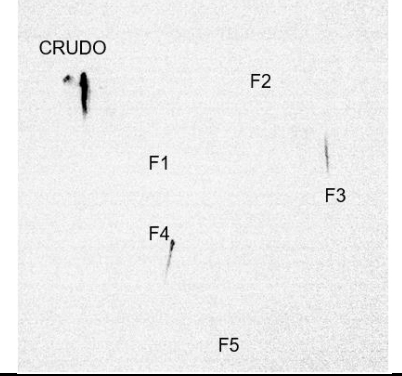
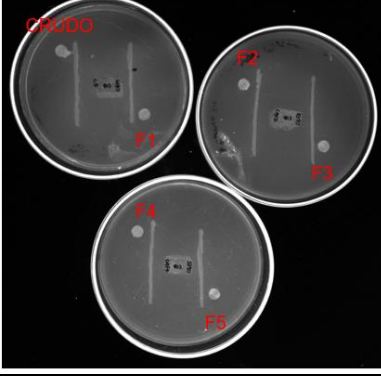
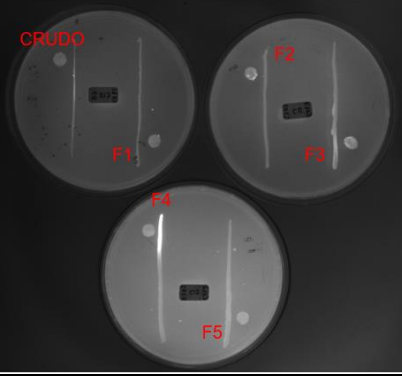
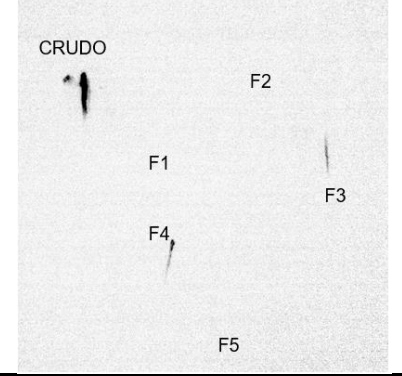
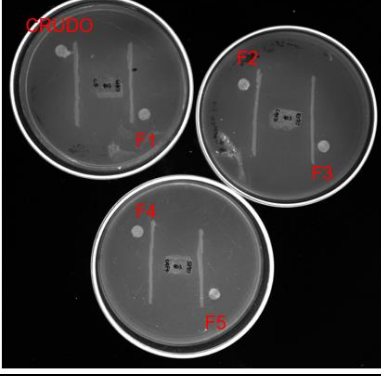
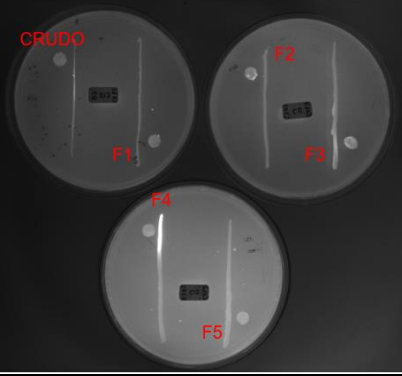
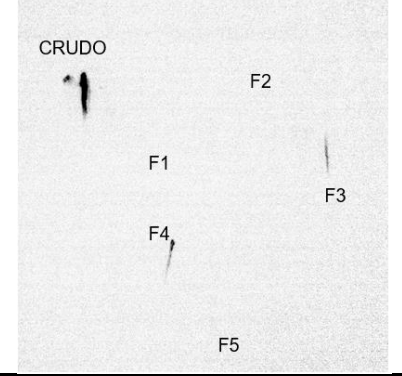
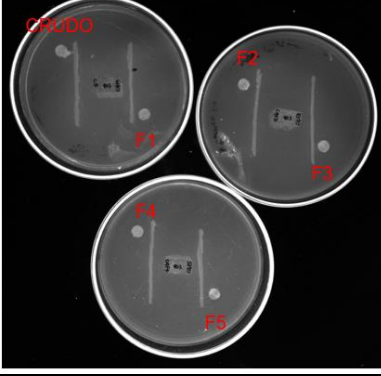
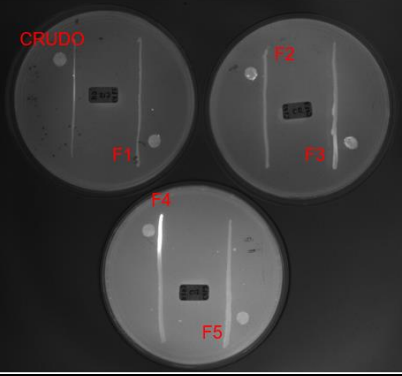
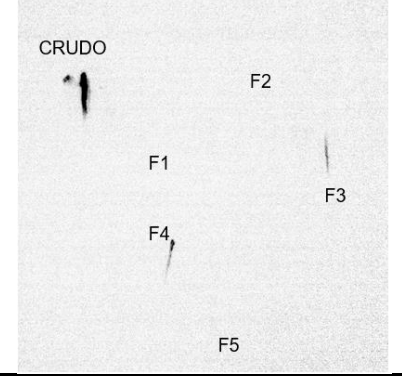
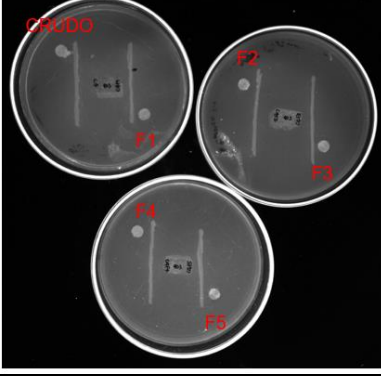
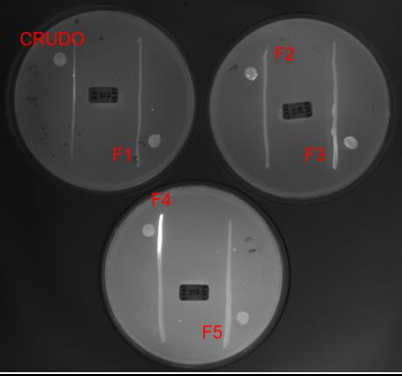
Lo anterior podría explicar por qué en la Figura 10 (página 78), las manchas reveladas sobre los carriles correspondientes a CCBBBdMc-11 y CCBBBdOf-5 son más tenues. Los resultados obtenidos en los ensayos de detección con el biosensor pKR-C12 (Figura 8, página 73 y Figura 9, página 75), indicaron la producción de AHLs de cadena larga (como la 3-oxo-C12 y/o la 3-oxo-C10 AHLs), sin embargo en la cromatografía no se reveló ninguna mancha cercana a la línea base, esto pudo deberse a que estas moléculas probablemente se encuentran a una concentración que está por debajo del límite de detección del biosensor pZLR4.

Con el objetivo de obtener una caracterización más completa de las moléculas señal producidas por cepas de *Stappia indica*, y más allá de los objetivos propuestos en el presente trabajo, se planteó un análisis por CD-FID de los extractos obtenidos de las bacterias objeto de estudio. Para ello, se realizó la purificación de los extractos crudos de las bacterias por fraccionamiento en cartuchos de extracción en fase sólida, una vez fraccionados, se evaluó la actividad de cada una de sus fracciones usando para esto dos biosensores bacterianos pSB 403 y pKR-C12.

Los resultados de la evaluación de la actividad de las fracciones de extractos se encuentran en la Tabla 10 (página 81), donde se observa que las fracciones con actividad dominante fueron la tres y la cuatro para ambos biosensores, mientras que las fracciones dos de los aislamientos CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21 y CCBhMc-3 indujeron, aunque débilmente, al biosensor pSB403 lo cual podría indicar que las moléculas de señalización presentes en cada una de las muestras poseen una polaridad media-alta, correspondientes a AHLs de cadena media (como la C6 y la C8 AHLs). La fracción cinco de la cepa CCBhMc-3 mostró actividad frente al biosensor pKR-C12, siendo la única, junto con la fracción cinco del control positivo (PAO1) en mostrar este comportamiento, esto podría significar que, al menos esta cepa, produce cantidades detectables de una AHL similar a la C4-AHL, que es más polar.

Después de la purificación, fue evidente que para todas las cepas (excepto CCBBBdOf-5, el blanco y el control negativo), había actividad en más de dos fracciones, razón por la cual, los análisis por CG-FID se llevaron a cabo con las fracciones reconstituidas de cada uno de los extractos. La identificación tentativa de las AHLs producidas por *Stappia indica* se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de los patrones sintéticos (Figura 11, página 87, primera línea) con el resultado del cálculo de los índices de retención de Kovats. Los índices de retención de Kovats se calcularon de la Ecuación 2 (página 37) usando como parámetros los tiempos de retención de cada una de las señales de los cromatogramas y los tiempos de retención de parafinas de diferentes tamaños. Los valores de los índices de Kovats calculados para los patrones sintéticos y las señales obtenidas para cada extracto se encuentran en la Tabla 11. La identificación de los patrones sintéticos se hizo por CG-EM Los tiempos de retención obtenidos para todas las señales y los espectros de masas de los patrones sintéticos se encuentran disponibles en el Anexo 4, página 121.

Tabla 10. Resultados fraccionamiento de los extractos.

Extracto	Fracción	403	C12	pSB403		pKR-C12
CCBBBdMc-11	CRUDO	azul	azul			
	F1	rojo	rojo			
	F2	amarillo	rojo			
	F3	azul	azul			
	F4	azul	azul			
	F5	rojo	amarillo			
CCBBBdOf-5	CRUDO	azul	amarillo			
	F1	rojo	rojo			
	F2	rojo	rojo			
	F3	amarillo	amarillo			
	F4	amarillo	azul			
	F5	rojo	rojo			

Resultados fraccionamiento de los extractos. En las columnas 3 y 4 está la clave de color de los resultados de inducción de los biosensores en cada fracción de los extractos así: azul: resultado positivo; amarillo: positivo débil; rojo: resultado negativo. Los resultados de la bioluminiscencia del biosensor pSB403 se observan en la columna 5, con la foto respectiva del montaje al lado derecho. Los resultados de la producción de *gfp* en el biosensor pKR-C12 inducida por las fracciones se observan en la columna 6. Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 fueron tomadas usando el digitalizador de imágenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad. La producción de *gfp* fue observada en el mismo digitalizador de imágenes con un filtro UV XcitaBlue™ 1708182.

Extracto	Fracción	403	C12	pSB403		pKR-C12
CCBBBdOf-9	CRUDO	Yellow	Yellow			
	F1	Red	Red			
	F2	Yellow	Red			
	F3	Blue	Blue			
	F4	Blue	Blue			
	F5	Red	Red			
CCBBBdOf-21	CRUDO	Blue	Blue			
	F1	Red	Red			
	F2	Yellow	Red			
	F3	Blue	Blue			
	F4	Blue	Blue			
	F5	Red	Red			

Resultados fraccionamiento de los extractos (Continuación). En las columnas 3 y 4 está la clave de color de los resultados de inducción de los biosensores en cada fracción de los extractos así: azul: resultado positivo; amarillo: positivo débil; rojo: resultado negativo. Los resultados de la bioluminiscencia del biosensor pSB403 se observan en la columna 5, con la foto respectiva del montaje al lado derecho. Los resultados de la producción de *gfp* en el biosensor pKR-C12 inducida por las fracciones se observan en la columna 6. Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 fueron tomadas usando el digitalizador de imágenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad. La producción de *gfp* fue observada en el mismo digitalizador de imágenes con un filtro UV XcitaBlue™ 1708182.

Extracto	Fracción	403	C12	pSB403		pKR-C12
CCBhMc-3	CRUDO	Blue	Blue			
	F1	Red	Red			
	F2	Yellow	Red			
	F3	Blue	Yellow			
	F4	Blue	Blue			
	F5	Red	Blue			
Blanco	CRUDO	Red	Red			
	F1	Red	Red			
	F2	Red	Red			
	F3	Red	Red			
	F4	Red	Red			
	F5	Red	Red			

Resultados fraccionamiento de los extractos (Continuación). En las columnas 3 y 4 está la clave de color de los resultados de inducción de los biosensores en cada fracción de los extractos así: azul: resultado positivo; amarillo: positivo débil; rojo: resultado negativo. Los resultados de la bioluminiscencia del biosensor pSB403 se observan en la columna 5, con la foto respectiva del montaje al lado derecho. Los resultados de la producción de *gfp* en el biosensor pKR-C12 inducida por las fracciones se observan en la columna 6. Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 fueron tomadas usando el digitalizador de imágenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad. La producción de *gfp* fue observada en el mismo digitalizador de imágenes con un filtro UV XcitaBlue™ 1708182.

Extracto	Fracción	403	C12	pSB403	pKR-C12	Extracto	
C (+) PAO1	CRUDO						
	F1						
	F2						
	F3						
	F4						
	F5						
C (-) 117	CRUDO						
	F1						
	F2						
	F3						
	F4						
	F5						

Resultados fraccionamiento de los extractos (Continuación). En las columnas 3 y 4 está la clave de color de los resultados de inducción de los biosensores en cada fracción de los extractos así: azul: resultado positivo; amarillo: positivo débil; rojo: resultado negativo; rosado: falso positivo. Los resultados de la bioluminiscencia del biosensor pSB403 se observan en la columna 5, con la foto respectiva del montaje al lado derecho. Los resultados de la producción de *gfp* en el biosensor pKR-C12 inducida por las fracciones se observan en la columna 6. Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 fueron tomadas usando el digitalizador de imágenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad. La producción de *gfp* fue observada en el mismo digitalizador de imágenes con un filtro UV XcitaBlue™ 1708182.

Tabla 11. Índices de retención de las AHLs producidas por *S. indica*.

Patrones sintéticos	Patrones IR	CCBBBdOf-5 (IR)	CCBBBdOf-9 (IR)	CCBBBdOf-21 (IR)	CCBBBdMc-11 (IR)	CCBhMc-3 (IR)
C4-AHL	1968	1983	1956	1955	1955	1955
C6-AHL	2493	2478	2481	2483	2483	2477
C8- AHL	2999	2995	3010	2990	2999	2997
3-oxo-C6- AHL	3256	3270	-	-	-	-
C10- AHL	3414	3418	-	-	-	-
C12- AHL	3835	3831	3838	3842	3834	3832
3-oxo-C12- AHL	3857	3855	3856	-	3863	-

Se muestran los índices de retención calculados para cada señal obtenida de los análisis por CG de los extractos purificados de moléculas señal de las cepas de *S. indica*.

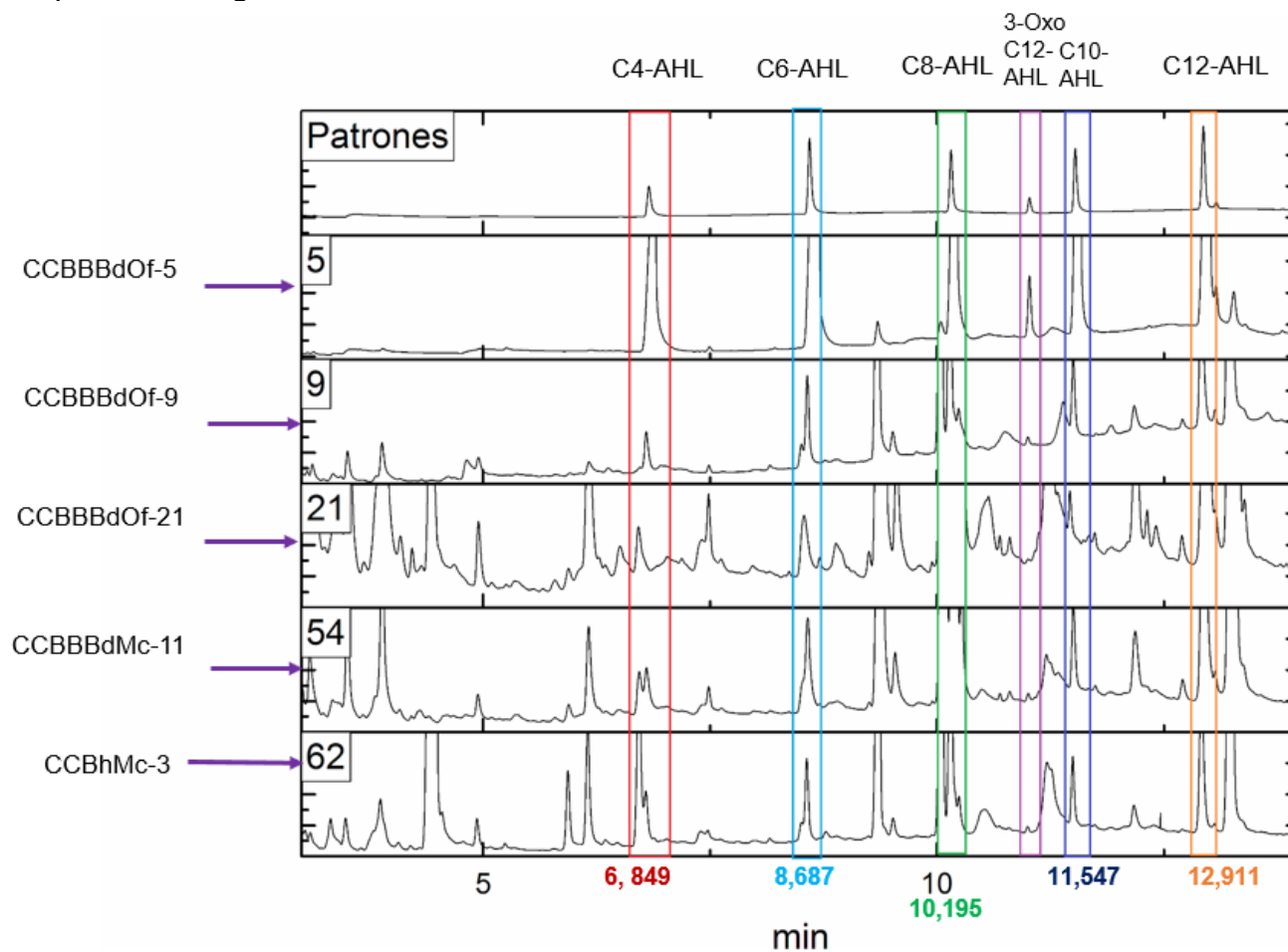
Por comparación entre los índices de Kovats obtenidos para cada señal, en cada extracto con los de los patrones sintéticos, es posible afirmar que la cepa CCBBBdOf-5 produce la mayor variedad de AHLs, pues los índices de retención de sus siete señales tienen valores muy cercanos a los de los patrones sintéticos empleados para la comparación. Las cepas CCBBBdOf-9 y CCBBBdMc-11 mostraron dos señales menos que la cepa CCBBBdOf-5 correspondientes a las señales de 3-oxoC6-AHL y C10-AHL, lo que significa que estas dos cepas producen C4-AHL, C6-AHL, C8-AHL, C12-AHL, y 3-oxo-C12-AHL, de acuerdo con los valores de los índices de Kovats. Finalmente, se pudo identificar las moléculas señal tipo AHLs producidas por las cepas CCBBBdOf-21 y CCBhMc-3, se trataría entonces de C4-AHL, C6-AHL, C8-AHL y C12-AHL y los índices de retención de las estas señales son similares a los valores obtenidos para los patrones sintéticos.

Estos resultados demuestran que *S. indica* tiene la capacidad de producir una amplia variedad de AHLs, y que la tasa de producción de estas moléculas varía dependiendo de la cepa. Aunque no se puede establecer la relación entre la comunidad a partir de la cual fueron obtenidos estos aislamientos y la producción de las diferentes AHLs, sí se puede afirmar, al menos para este caso particular, que la cepa CCBhMc-3 proveniente de una muestra de coral sano produce menos AHLs que las cepas provenientes de los corales enfermos. Este comportamiento lo hemos visto en otros estudios realizados por el grupo, en los que bacterias aisladas de comunidades asociadas a una enfermedad tiene más AHLs activas que las

aisladas de organismos sanos (A. Cárdenas et al., 2012; Franco et al., 2015), y aunque mucha evidencia es aún necesaria, esto puede ser un indicador de desbalances en los procesos de comunicación y falta de sincronía entre los organismos involucrados en un ecosistema. En este caso particular, un indicador de las relaciones que se establecen entre los miembros de las comunidades bacterianas de los corales *Montastrea cavernosa* y *Orbicella faveolata* enfermos de Banda Negra.

A niveles superiores *S. indica* es una Alfabroteobacteria, perteneciente al orden de los Rhizobiales y a la familia Rhodobacteraceae, estos niveles han sido bien caracterizados y se conoce que la familia de los Rhodobacteraceae contienen diferentes Agentes Transferentes de genes homólogos a los encontrados en *Rhodobacter capsulatus* (RcGTA por sus siglas en ingles), y que este fenotipo es regulado por diferentes proteínas del organismo hospedero entre las que se encuentran involucradas las proteínas GtaI y GtaR pertenecientes al sistema de comunicación bacteriana de *Quorum Sensing* de *R. capsulatus* (Westbye et al., 2013). Dentro de los datos recopilados, se observa que *S. indica* se encuentra en gran proporción en las muestras de corales analizados, siendo ésta una bacteria motil, capaz de hidrolizar proteínas como la caseína, reducir nitratos hasta nitrógeno elemental y fue aislada por primera vez en el Océano Índico formando parte de un consorcio de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (Lai et al., 2010). Se podría suponer que algunos de estos fenotipos podrían estar regulados por las moléculas señal sintetizadas por esta bacteria y diseñar, para futuros trabajos, experimentos particulares que permitieran establecer esa regulación.

Figura 11. Análisis por Cromatografía de Gases de las moléculas señal del QS extraídas.



Por comparación con los tiempos de retención de los patrones sintéticos (primera línea), es probable que las moléculas de señalización producidas por cepas de estudio CCBBBdOf-5, CCBBBdOf-9, CCBBBdOf-21, CCBBBdMc-11 y CCBhMc-3 sean desde C4 hasta C12-AHLs, y 3-oxo-C12-AHL.

4. Búsqueda de los posibles componentes del sistema de *Quorum Sensing* en *Stappia indica* mediante herramientas computacionales.

La evidencia experimental recolectada en el presente trabajo demuestra que *Stappia indica* es capaz de producir C4-, C6-, 3-oxo-C6, C8-, C10, C12 y 3-oxo-C12-Acil-Homoserín-Lactonas. Con el fin de encontrar los componentes del sistema de QS asociados con la producción de estas moléculas de señalización, el trabajo experimental se complementó con el análisis computacional. En principio, se hizo la búsqueda de posibles secuencias codificantes para proteínas AHL-sintasas tipo LuxI y factores de regulación transcripcional tipo LuxR del *Quorum Sensing*, aprovechando la disponibilidad de tres genomas de *Stappia indica* secuenciados y anotados en el *GenBank*, entre los que se incluye el genoma de la cepa de estudio del presente trabajo CCBhMc-3 (*BioProject* PRJNA328866).

Considerando que los componentes principales de un sistema canónico de QS incluyen por una parte la proteína responsable de la síntesis de la molécula señal (proteínas de la familia LuxI), y por la otra, la(s) proteína(s) receptoras (proteínas de la familia LuxR), la búsqueda realizadas se dirigió a estos dos objetivos.

4.1. Búsqueda de la proteína AHL-sintasa tipo LuxI en *S. indica*

LuxI es una familia de proteínas bien conservada, por lo que se comparó el listado de secuencias de proteínas tipo LuxI construida por Britstein *et al.* (2015), con los genomas de *S. indica* a través de la herramienta TBLASTN de NCBI (Britstein *et al.*, 2015). Como resultado de la búsqueda, se determinó que existe una única secuencia de nucleótidos de 656 pb codificante para este tipo de proteínas, localizada en el Nodo 2 del genoma de *S. indica* CCBhMc-3 (*BioProject* PRJNA328866), en la región complementaria de las posiciones 333227 a 333883 (*GenBank*: MBQE01000002.1) (ver Figura 15, página 97).

Luego de identificar una secuencia codificante para este tipo de proteínas, se repitió la búsqueda, esta vez con la herramienta BLASTP, en la base de datos de proteínas no redundantes, filtrando por organismo y se encontró una proteína

anotada automáticamente como “*Conjugal transfer protein Tral*,” con el número de acceso WP_067219032.1, en el proteoma traducido de la cepa CCBhMc-3 (*S. indica* SBBC49 MBQE01) y tiene una longitud de 218 aa. La secuencia de la proteína candidata a AHL-sintasa de *S. indica* es similar a las AHL-sintasas Tral reportadas para varias especies de *Mesorhizobium* spp., con porcentajes de identidad de secuencia que están entre 67 y 72% y con coberturas entre 93 y 100%.

Para verificar que esta proteína corresponde a la AHL-sintasa de *S. indica*, se realizaron alineamientos múltiples con varias secuencias de proteínas tipo LuxI de referencia buscando los residuos de aminoácidos conservados que tienen un papel clave en la actividad catalítica de la enzima. Las secuencias de las proteínas de referencia empleadas para la comparación fueron Tral de *Mesorhizobium japonicum* (UniProt Q98A90), Bjal de *Bradyrhizobium diazoefficiens* (UniProt Q89VI2), Tral de *Agrobacterium tumefaciens* (UniProt P33904), Cvil de *Chromobacterium violaceum* (UniProt Q83XU6), Sinl de *Sinorhizobium meliloti* (UniProt Q92PD0), Lasl de *Pseudomonas aeruginosa* (UniProt P33883) y LuxI de *Aliivibrio fischeri* (UniProt P12747). En la Figura 12 A (página 92), se muestra la presencia de estos aminoácidos conservados, como se ha descrito previamente en diferentes estudios (Dong et al., 2017; C. Fuqua & Greenberg, 2002; Gould, Schweizer, & Churchill, 2004; Hanzelka, Stevens, Parsek, Crone, & Greenberg, 1997; Parsek, Schaefer, & Greenberg, 2003).

Los residuos conservados y que son esenciales para la actividad catalítica de las enzimas AHL-sintasas tipo LuxI se encuentran organizados en cuatro segmentos de la proteína. En el primer segmento se encuentran estrictamente conservados ubicados en la hélice α_2 y el siguiente *loop* R~22, F~28 y W~34 (~ indica posiciones relativas). En la secuencia de la proteína candidata a AHL-sintasa de *S. indica* se encontraron los residuos conservados correspondientes en las posiciones: R24, F28, W34.

El segundo y tercer segmento consisten en los residuos D~46, D~49, R~69 y R~103; la proteína candidata a AHL-sintasa de *S. indica* tiene esos residuos

conservados en las posiciones, D45, D48, R69 y R103. Un quinto residuo conservado en este bloque, E-100, es esencial para la síntesis de AHL en LuxI y RhII, La proteína de *Stappia indica*, también contiene este residuo conservado en la misma posición.

Las enzimas AHL-sintasas tipo LuxI tienen, además, otro dominio, denominado el dominio de especificidad a sustrato. Este dominio reconoce a los sustratos que harán parte de la región acilada de la molécula AHL y también se caracteriza por contar con residuos de aminoácidos conservados tales como A~133, T~143 (residuo conservado en proteínas homólogas que sintetizan 3-oxo-AHLs), E~150 y G~164 (Dong et al., 2017; C. Fuqua & Greenberg, 2002).

En resumen, en la secuencia de la posible AHL-sintasa de *S. indica* se encuentran los residuos conservados correspondientes a la región catalítica en las posiciones: R24, F28, W34, E43, D45, D48, D61, R69, F83, E100, y R103. También están presentes los residuos conservados E151 y G158, que se localizan en la región de especificidad de sustrato en la enzima incluyendo el residuo conservado T144 en homólogos que sintetizan 3-oxo-AHLs.

Con el objetivo de establecer la relación entre la posible AHL sintasa de *S. indica* con los miembros de la familia de las AHLs sintasas LuxI se construyó un dendrograma, que se puede observar en la Figura 12 (página 92), en el cual la secuencia de la posible AHL sintasa de *S. indica* se compara con secuencias de referencia relacionadas. En el alineamiento llevado a cabo con método de probabilidad máxima, la proteína candidata a AHL-sintasa de *S. indica* se agrupó en el 89% de las veces con su homólogo N-acetil transferasa de *M. japonicum*, ambos se agruparon con la proteína de referencia Tral de *A. tumefaciens*.

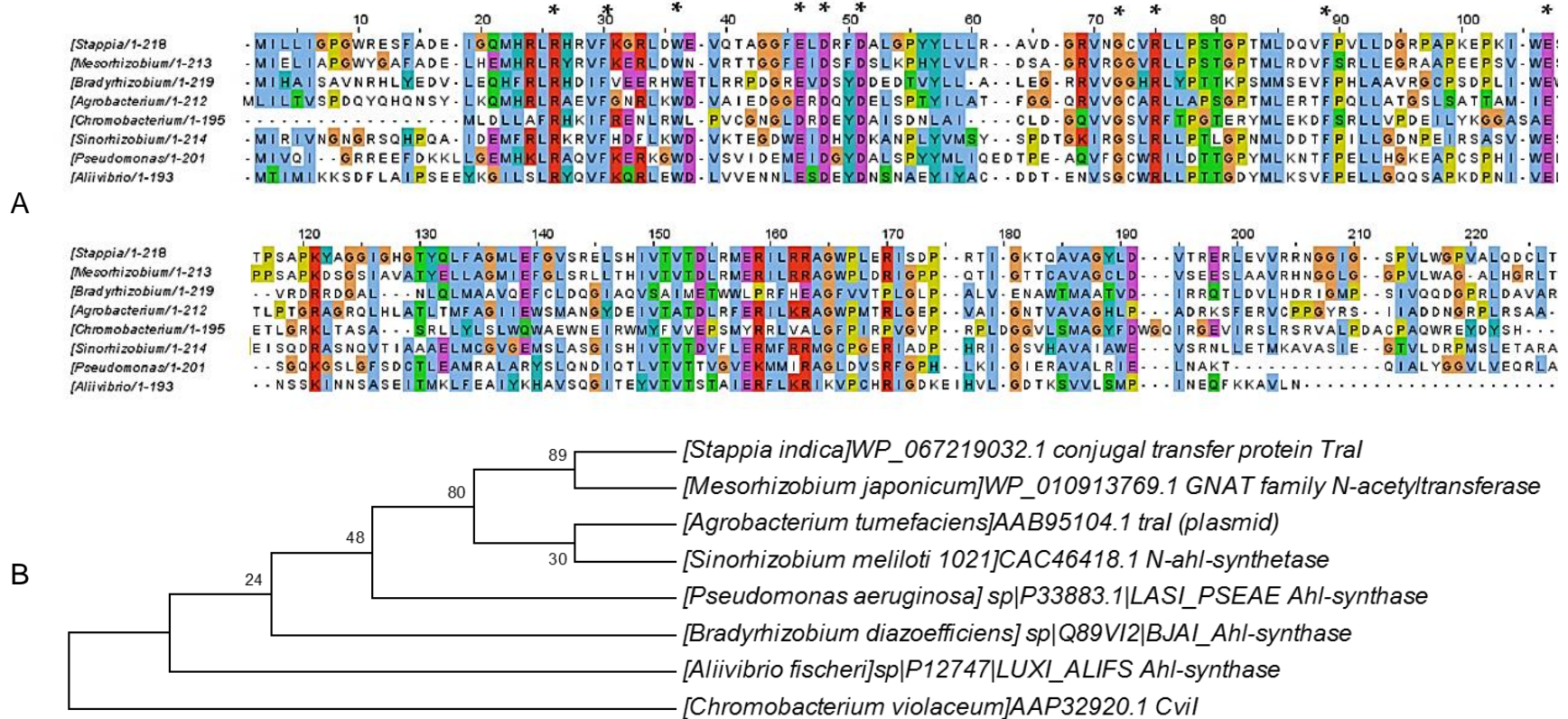
Las secuencias de las proteínas AHL-sintasas de *S. indica*, *M. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp., *S. meliloti* y *A. tumefaciens* se agrupan en el mismo cluster, dada la relación filogenética cercana que existe entre estas especies, todas miembros de la clase alfa-proteobacteria y todas pertenecientes al orden Rhizobiales, excepto *S. indica* que pertenece a los Rhodobacterales. Otra relación

existente entre las proteínas de referencia, es la dependencia de acil- CoA y no acil-ACP para la síntesis de las moléculas AHLs de las alfa-proteobacterias (Barriuso & Martínez, 2018; Dong et al., 2017).

Con la herramienta *Conserved domains* del NCBI se obtuvo un resultado específico de la arquitectura de dominio de una acil-homoserín lactona sintasa de la familia LasI para la posible AHL-sintasa de *S. indica*. Entre los resultados no específicos estaban los términos “Auto inductor sintasas” y la superfamilia de las N-acetil transferasas. Hasta este punto, todos los resultados indicaban que la secuencia de la *posible* AHL-sintasa de *S. indica* posee todas las características de secuencia de las proteínas que se encargan de la síntesis de auto inductores en bacterias y, en términos generales, a las N-acetil transferasas, superfamilia a la que pertenecen este tipo de enzimas.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia de la proteína candidata a AHL-sintasa de *S. indica* CCBhMC-3 (WP_067219032.1) tiene una extensión de 218 aminoácidos, tiene una localización citosólica, por lo tanto, no cuenta con péptido señal. A continuación, se hizo la predicción de la estructura secundaria para identificar residuos de aminoácidos conservados. Esto se llevó a cabo a través de la herramienta Gor4 (Garnier *et al.*, 1996). Los resultados mostrados en la Figura 13 (página 93), indican que la proteína tiene una conformación principal de *random coil* (116 residuos, 53,21%), seguido por la conformación alfa-helicoidal (74 residuos, 33,94%) y en menor proporción por láminas beta en conformación extendida (28 residuos, 12,84%). Esta predicción indica que la proteína no tiene en su estructura alfa-hélices 3_{10} , puentes y/o giros beta, regiones dobladas ni cualquier otro estado ambiguo.

Figura 12. Comparación de la secuencia de la posible AHL sintasa de *S. indica*, con diferentes proteínas de referencia.



- A. Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas tipo LuxI, incluyendo la posible AHL-sintasa de *S. indica* (primera línea). Las secuencias de referencia son *Tral* de *M. japonicum*, *B. japonicum*, *A. tumefaciens*, *C. violaceum*, *S. meliloti*, *P. aeruginosa* y *A. fischeri*, en orden descendente. Se muestran los aminoácidos clave para la actividad catalítica de la enzima marcados con asteriscos. R, F, W, E, D, D, G, R, F, E, R.
- B. Dendrograma de las secuencias tipo LuxI. El análisis se hizo con el método de probabilidad máxima, basado en el modelo de matriz JTT. Se muestra el árbol con el logaritmo de probabilidad más alto (-3208.3527). El porcentaje de árboles en los cuales los *cluster* asociados se agruparon juntos se muestra junto a las ramas. El (los) árbol(es) inicial(es) para el análisis heurístico se obtuvo automáticamente aplicando los algoritmos *Neighbor-Joining* y *BioNJ*, a una matriz de distancias apareadas usando el modelo JTT, y seleccionando entonces la topología con el valor de log probabilidad más alto. El árbol se dibuja a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 8 secuencias de aminoácidos.

Figura 13. Predicción de la estructura secundaria de la AHL-sintasa de *S. indica*.

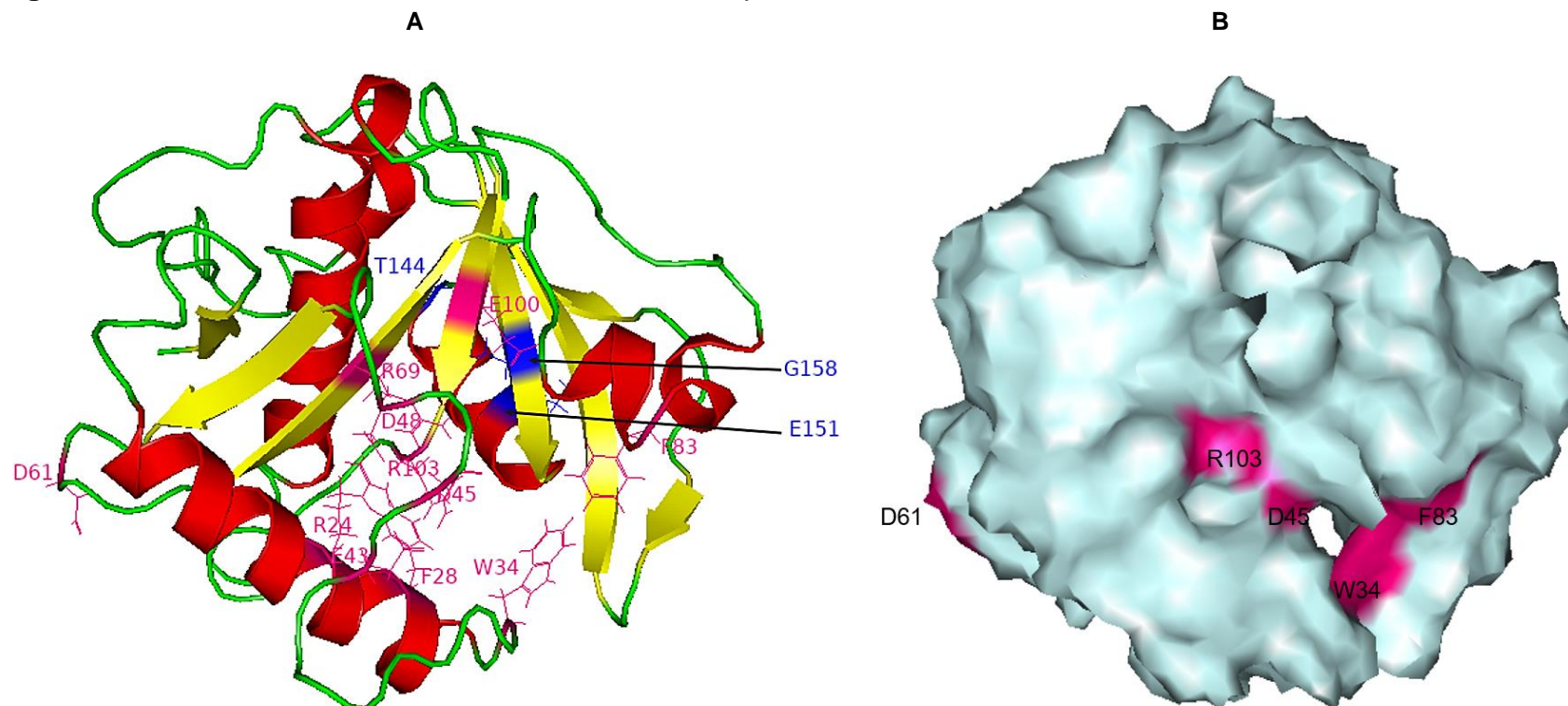


c: random coil; e: lámina beta en conformación extendida; h: alfa hélice.

La predicción de la estructura terciaria se hizo por *Threading* en la plataforma de I-Tasser (Bienert et al., 2017; Guex et al., 2009; Roy et al., 2010; A. Waterhouse et al., 2018; Yang et al., 2014; Zhang, 2008). El modelo obtenido se basa en un conjunto de estructuras de proteínas cristalizadas tipo LuxI, entre las que se encuentran la estructura 1RO5A de LasI (PDB: P33883) (Gould, Schweizer, et al., 2004), y en mayor proporción la estructura elucidada para la AHL-sintasa de *Bradyrhizobium japonicum* Bjal, 5W8A (Dong et al., 2017). El valor de *C-score* para este modelo fue de 0,74 (en un rango de [-5,2], indicando un alto índice de confianza), el valor normalizado del *TM-score* fue de 0,81, siendo 1 el valor más alto, indicando una buena calidad del modelo.

En la Figura 14 A (página 94) se muestra que los residuos conservados que anteriormente se habían visto (ver Figura 12 A, página 92), que hacen parte del dominio catalítico, en efecto hacen parte de la misma región estructural. También se puede observar en la Figura 14 B, que muestra la superficie de la estructura, que los residuos de la región catalítica se encuentran expuestos en una hendidura. Todo esto indica que este modelo probablemente representa una proteína funcional.

Figura 14. Modelamiento de la estructura terciaria de la proteína AHL-sintasa de *S. indica*.



Estructura modelada por *threading*, usando como plantilla principal la estructura cristalizada de la AHL-sintasa 5W8A de *Bradyrhizobium japonicum* Bjal, en el servidor de I-Tasser. La estructura de Bjal se determinó por cristalografía de rayos x, con una resolución de 2.0 Å (Dong *et al.*, 2017).

A. Los colores de la estructura representan rojo: residuos en conformación de hélice, amarillo: residuos en conformación de hoja plegada, verde: residuos en conformación de *random coil*. En color magenta se muestran los residuos conservados correspondientes al dominio catalítico: R24, F28, W34, E43, D45, D48, D61, R69, F83, E100, y R103. En color azul se muestran los residuos conservados que se localizan en la región de especificidad de sustrato en la enzima: T144, E151 y G158.

B. Estructura en superficie de la AHL-sintasa de *S. indica* modelada por *threading*. En color magenta se muestran algunos de los residuos del dominio catalítico.

Con estos resultados se puede concluir que la secuencia de nucleótidos reportada en el *GenBank* como MBQE01000002.1, efectivamente codifica una proteína funcional (WP_067219032.1) que tiene todas las características de una proteína AHL-sintasa, similar a la AHL- sintasa Bjal de *Bradyrhizobium japonicum*. **Se propone el nombre de Sinsl, para esta proteína que, según las evidencias experimentales aquí reportadas, podría ser la encargada de la síntesis de una amplia variedad de AHLs en *S. indica*.** Encontrar una sola secuencia codificante para la proteína AHL-sintasa, puede significar que la bacteria podría estar haciendo uso de diferentes mecanismos para sintetizar sus diferentes moléculas señal.

4.2. *Búsqueda de la(s) estructura(s) de la(s) posible(s) proteína(s) Factor de Regulación Transcripcional tipo LuxR de *S. indica*.*

Las proteínas reguladoras de la transcripción de la familia LuxR son conocidas por tener una arquitectura de dos dominios, un dominio de unión a ligando en el extremo N-terminal y un dominio bien conservado de unión a ADN con un motivo Hélice-Giro-Hélice (HTH por sus siglas en inglés *Helix-Turn-Helix*), en el extremo C-terminal (Subramoni, Florez Salcedo, & Suarez-Moreno, 2015).

Para encontrar proteínas que puedan cumplir esta función en *S. indica*, en primer lugar, se elaboró un listado de secuencias de proteínas tipo LuxR y similar a la metodología usada para las proteínas tipo LuxI, luego se realizó una búsqueda de secuencias codificantes para proteínas tipo LuxR en los genomas de *S. indica*. Este tipo de búsqueda generó resultados con secuencias de proteínas hipotéticas que no tenían relación con la anotación de factores de regulación transcripcional.

Teniendo en cuenta que el dominio de unión a ADN está bien conservado en la naturaleza y en la familia de proteínas tipo LuxR, se utilizó una segunda estrategia y se llevó a cabo una búsqueda por términos en la base de datos de UniProt para determinar la existencia de secuencias codificantes para proteínas con esta característica dentro del genoma de *S. indica*. en total se obtuvieron siete

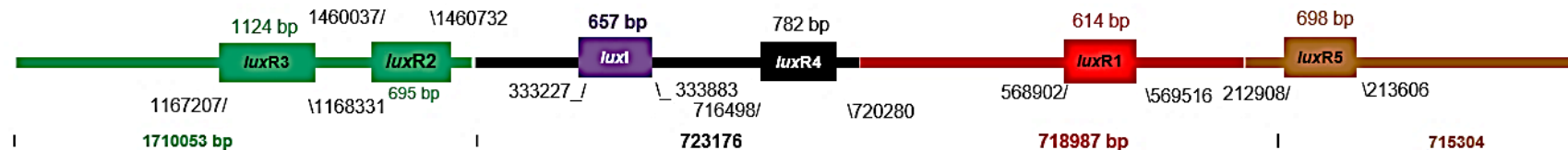
resultados (*Hits*) para posibles proteínas factores de regulación transcripcional del *Quorum Sensing* de la familia LuxR.

Haciendo comparaciones a través de alineamientos múltiples con secuencias de proteínas tipo LuxR de referencia, fue posible determinar que cinco de estos resultados contenían los dos dominios característicos de este tipo de proteínas. Los resultados de las proteínas candidatas a factor de regulación transcripcional tipo LuxR de *Stappia indica* se encuentran enumeradas en la Tabla 12 (página 97). En la Figura 16 (página 98) se puede ver en la región delimitada por la caja verde el dominio HTH, de unión a ADN que se encuentra bien conservado y que es característico de las proteínas reguladoras de respuesta. El dominio de unión a ligando delimitado en la caja roja está menos conservado entre las proteínas tipo LuxR.

Tabla 12. Proteínas candidatas a Factores de Regulación Transcripcional tipo LuxR de *S. indica*.

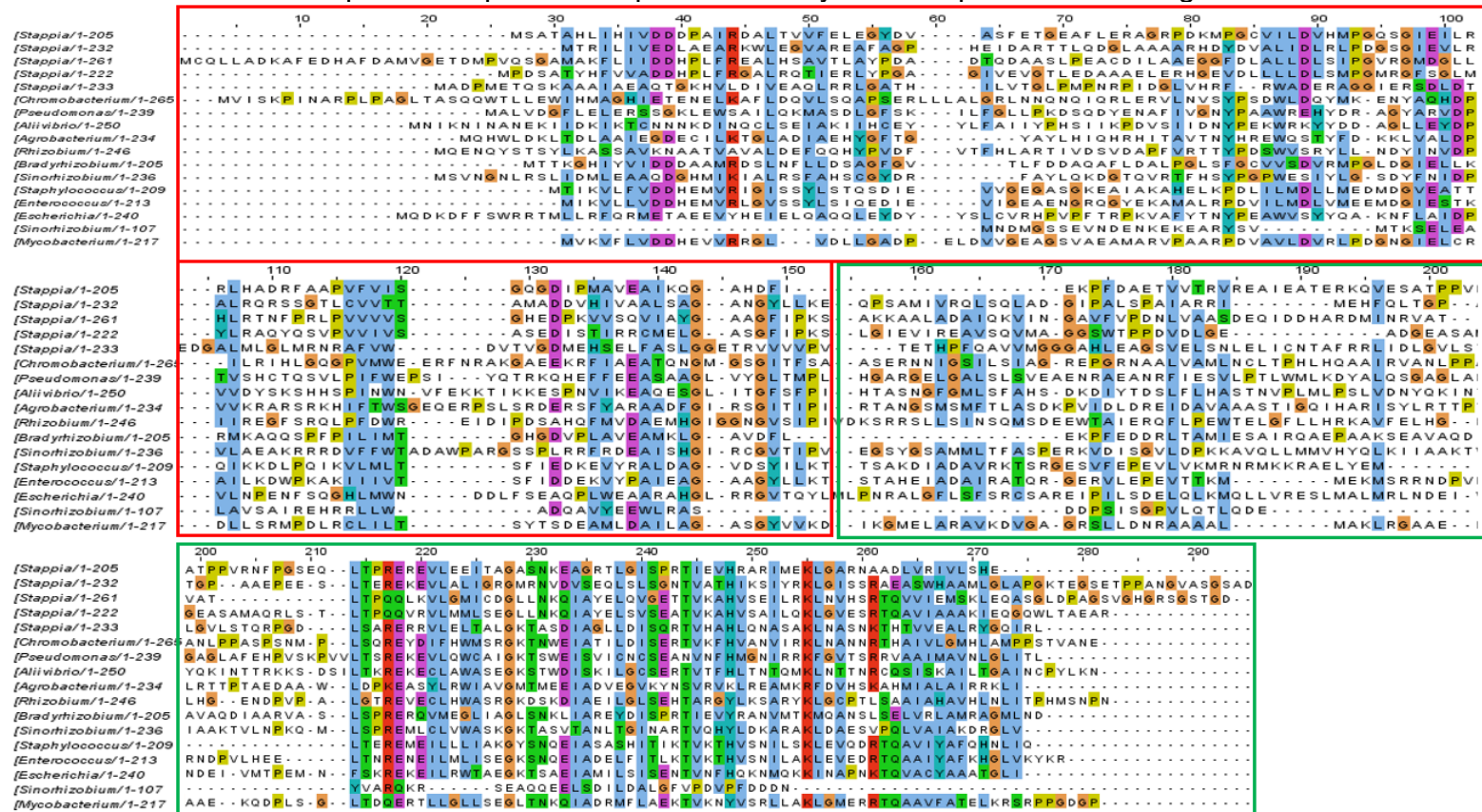
No. Resultado	Acceso a UniProt	Nombre de Acceso	Proteína	Genes	Longitud	Característica	Posición	Descripción	Longitud del dominio
<u>1</u>	A0A285SW95	A0A285SW95_9RHOB	Two component transcriptional regulator	SAMN05421512_106278	205	Dominio	7-123	Response regulator	117
						Dominio	140-205	HTH LuxR	66
<u>2</u>	A0A285R6C8	A0A285R6C8_9RHOB	Two component transcriptional regulator	SAMN05421512_101313	232	Dominio	3-120	Response regulator	118
						Dominio	144-209	HTH LuxR	66
<u>3</u>	A0A285SVV4	A0A285SVV4_9RHOB	Two component transcriptional regulator	SAMN05421512_106272	222	Dominio	306-363	HTH LuxR	58
<u>4</u>	A0A285SEN2	A0A285SEN2_9RHOB	Two component transcriptional regulator	SAMN05421512_1057	261	Dominio	33-150	Response regulator	118
						Dominio	175-240	HTH LuxR	66
<u>5</u>	A0A285RST4	A0A285RST4_9RHOB	Regulatory protein, luxR family	SAMN05421512_102429	233	Dominio	164-229	HTH LuxR	66

Figura 15. Representación de la localización de los posibles genes codificantes para proteínas del sistema de QS en el genoma CCBhMc-3 de *Stappia indica*.



La caja morada representa el gen que codifica para la posible proteína AHL-sintasa. Las cajas roja, verdes, negra y mostaza representan los hits de las posibles proteínas factores de regulación transcripcional tipo LuxR encontradas en el genoma CCBhMc-3 de *Stappia indica* descritos en la Tabla 12.

Figura 16. Alineamiento múltiple de las proteínas tipo LuxR incluyendo las posibles homólogas de *S. indica*.



Se muestran los dominios conservados en la estructura primaria de las proteínas candidatas (en orden descendente 1-5) y las secuencias de las proteínas de referencia (en orden descendente así: CviR *C. violaceum*, LasR *P. aeruginosa*, LuxR *Aliivibrio fischeri*, TraR *A. tumefaciens*, TraR *Rhizobium leguminosarum*, FixJ *Bradirhizobium japonicum*, VraR *Staphylococcus aureus*, VraR *Enterococcus faecium*, SdiA *E. coli*, TraR *Sinorhizobium fredii*, DosR *Mycobacterium tuberculosis*). El dominio regulador de respuesta se observa en la caja roja; la caja verde indica el dominio de unión a DNA con el motivo HTH, esta última región de las secuencias es aquella mejor conservada.

Al ubicar los genes que codifican para estas cinco proteínas en el genoma de *S. indica* (Figura 15, página 97, Tabla 12, página 97) se encontró que éstas proteínas están codificadas por genes que se ubican en regiones distintas.

Para las cinco posibles proteínas reguladoras se elaboraron los modelos 3D a través de las mismas estrategias de modelamiento por homología y *threading*, con el fin de evaluar la arquitectura y los dominios conservados típicos de la familia LuxR. Estos resultados se pueden apreciar en la Tabla 13 (página 101). Los modelos obtenidos para la LuxR1 y LuxR5 son los modelos de mejor calidad, dado que para estos se encontraron plantillas de proteínas con estructura resuelta por cristalografía y que tienen una mayor identidad de secuencia con las proteínas de *S. indica*.

Con respecto a los modelos obtenidos, la proteína LuxR1 presentó una identidad de secuencia del 42,13% con la estructura de la proteína FixJ de *B. japonicum* y los valores GMQE y QMEAN indican que el modelo obtenido para esta proteína tiene una alta precisión y confiabilidad con estructuras de proteínas cristalizadas de tamaño similar. El modelo LuxR5 arrojó los valores más altos de confiabilidad y de similitud de estructura, por lo que es probable que esta proteína cumpla una función similar a la proteína cristalizada que sirvió como plantilla principal, SdiA de *E. coli*.

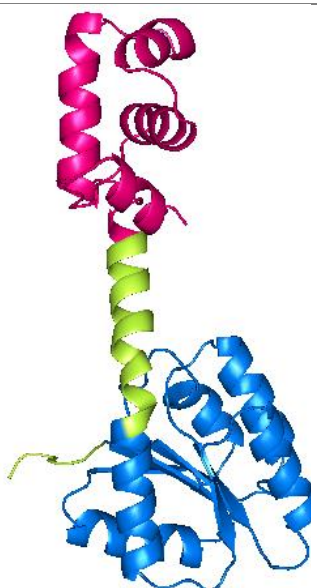
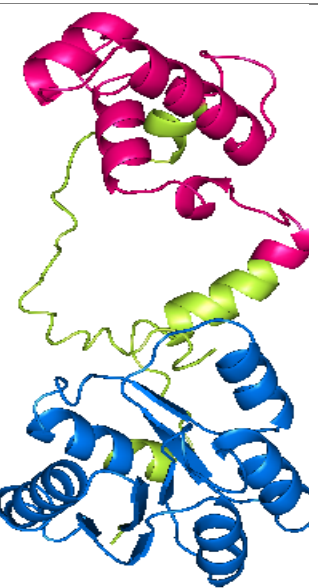
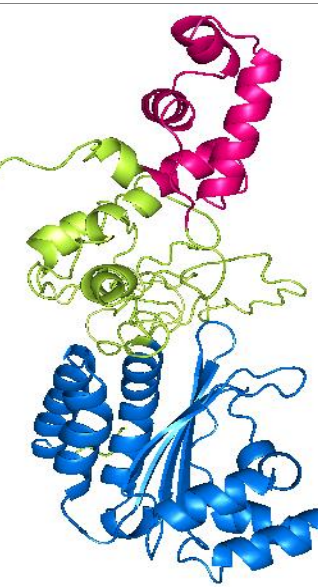
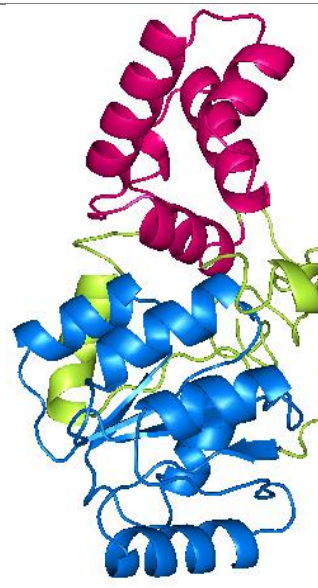
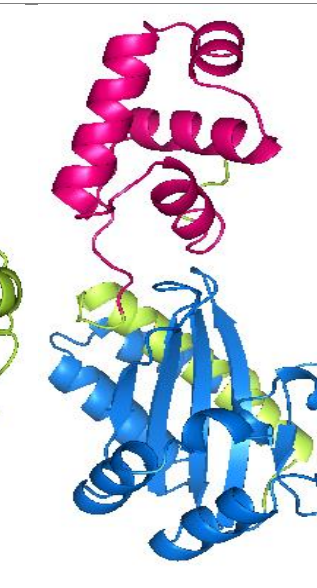
El modelo LuxR1 se construyó a partir de la plantilla 5xt2 FixJ de *B. japonicum*, cuya estructura fue elucidada por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2,65 Å (Wright *et al.*, 2018). FixJ es el regulador de respuesta del Sistema de dos componentes FixL/FixJ de *B. japonicum*, que permite que el mecanismo de fijación de nitrógeno de esta bacteria ocurra sólo bajo condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, momento en el que FixL (que es una proteína histidina quinasa) se auto fosforila y luego transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta FixJ, que estimula la expresión de genes requeridos para la fijación de nitrógeno (Wright *et al.*, 2018). La región HTH de la familia de proteínas LuxR es homóloga a regiones análogas de otras proteínas de unión a ADN, como la región

de unión a ADN de la subfamilia FixJ de la familia de proteínas reguladoras de respuesta de dos componentes (W. C. Fuqua & Winans, 1994).

Muchas proteínas contienen dominios conectados por enlazadores flexibles. Su conexión física significa que estos dominios se mantienen en una concentración altamente efectiva uno con respecto al otro. Para los receptores de QS de la familia LuxR existen dos estrategias generales por las cuales se puede alcanzar el objetivo (de la dimerización). La primera estrategia es identificar ligandos que se unen en lugar del auto inductor y que en mayor medida que el auto inductor favorecen una interacción de inactivación de dominio de unión a ADN-dominio de unión a ligando. Un segundo enfoque relacionado con el desarrollo del antagonista sería identificar las moléculas que se unen a los complejos de auto inductores-LuxR preformados de tal manera que se establezcan las conformaciones cerradas (Chen et al., 2012).

La proteína LuxR canónica se une a una AHL, la cual induce la dimerización de la proteína, la unión a ADN y la activación de la ARN polimerasa. Una segunda clase de receptor tipo LuxR es ejemplificado por EsaR, el cual se pliega, se dimeriza y se une al ADN en ausencia de su ligando AHL. La unión a ADN por apo-EsaR resulta en una represión transcripcional de los genes regulados por QS. Esta represión se alivia por la unión del auto inductor nativo a EsaR que inhibe la actividad de unión a ADN de EsaR (Chen et al., 2012).

Tabla 13. Estructuras de las posibles proteínas tipo LuxR de *S. indica*

LuxR1	LuxR2	LuxR3	LuxR4	LuxR5
				
Homología[£]	Threading	Threading	Threading	Threading
Plantilla^A: 5xT2	Plantilla^{*1}: 5heV	Plantilla^{*2}: 3qp6	Plantilla^{*3}: 4gvpA	Plantilla^{*4}: 4lgwA
% Id. Secuencia: 42,13	C-score: -0,61	C-score: -2,73	C-score: -1,39	C-score: 1,15
QMEAN: -0,47	TM-score: 0,64	TM-score: 0,4	TM-score: 0,54	TM-score: 0,84
GMQE: 0,75	RMSD: 7.0 ±4.1 Å	RMSD: 13.3 ±4.1 Å	RMSD: 9.0 ±4.6 Å	RMSD: 3,4 ±2,3 Å

£ Los parámetros de calidad para los modelos propuestos por homología son: el porcentaje de identidad de secuencia con una estructura de proteína cristalizada (>30%); un valor QMEAN positivo, cercano a cero; un valor GMQE, entre 0 y 1.

Δ Estructura cristalizada empleadas en el modelo por homología FixJ *Bradyrhizobium japonicum*.

¥ Estructura cristalizada utilizada como plantilla principal en cada modelo *threading*; ^{*1}5heV *LiaR* de *Enterococcus faecium*; ^{*2}CviR de *Chromobacterium violaceum*; ^{*3}VraR de *Staphylococcus aureus*; ^{*4}SdiA de *Escherichia coli*.

Los colores de las estructuras representan los diferentes dominios, en color azul se observa el dominio de unión a ligando, en color magenta se observa el dominio de unión a ADN caracterizado por el motivo HTH. En color verde se muestran las regiones intermedias entre los dominios principales.

El modelo LuxR2 se construyó principalmente a partir de la plantilla 5heV LiaR de *Enterococcus faecium*, cuya estructura se obtuvo por cristalografía de rayos X, con una resolución de 3.192 Å (Davlieva *et al.*, 2017), mientras que el modelo LuxR4 se construyó principalmente a partir de la plantilla 4gvpA VraR de *Staphylococcus aureus*, cuya estructura fue evaluada por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2,03 Å (Leonard, Golemi-Kotra, & Stock, 2013). Las proteínas LiaR de *Enterococcus faecium* y VraR de *Staphylococcus aureus* son reguladores de respuesta homólogos que después de fosforilarse, se une en una forma específica a una secuencia de ADN para regular la transcripción en respuesta a estrés en membrana de estas bacterias Gram positivas, confiriéndoles resistencia a antibióticos como la daptomicina y la vancomicina (Davlieva *et al.*, 2017).

El modelo LuxR3 se construyó principalmente a partir de la plantilla 3qp6 CviR de *Chromobacterium violaceum*, cuya estructura se elucidó por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2 Å (Chen *et al.*, 2012). CviR es una enzima de la familia de proteínas LuxR, CviR puede reconocer varias moléculas señal tipo AHLs como lo son C6-AHL, C8-AHL y C10-AHL. Una vez unida a alguno de estos ligandos CviR activa la transcripción de los genes blanco del sistema de QS de esta bacteria. La afinidad de CviR por estos ligandos disminuye a medida que el tamaño de las AHLs aumenta (Chen *et al.*, 2012).

Por último, el modelo LuxR5 se construyó principalmente a partir de la plantilla 4lgwA SdiA de *Escherichia coli*, cuya estructura se elucidó por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2,7 Å (T. Kim *et al.*, 2014). SdiA de *E. coli* (supresor del inhibidor de la división celular, por sus siglas en inglés) es un receptor de QS huérfano que responde a auto inductores producidos por otras especies bacterianas para controlar la división celular y la virulencia. La estructura cristalina revela que SdiA está compuesto por un dominio de unión a ligando en la región N-terminal y un dominio de unión a ADN en la región C-terminal y forma un dímero simétrico, también reveló el sitio de unión a ligando de SdiA está ampliamente abierto al solvente, razón por la cual SdiA puede acomodar fácilmente un amplio rango de ligandos: aunque la selectividad a sustrato de SdiA es relativamente

amplia hay indicios de que SdiA de *E. coli* tiene preferencia por auto inductores tipo AHLs. (T. Kim et al., 2014).

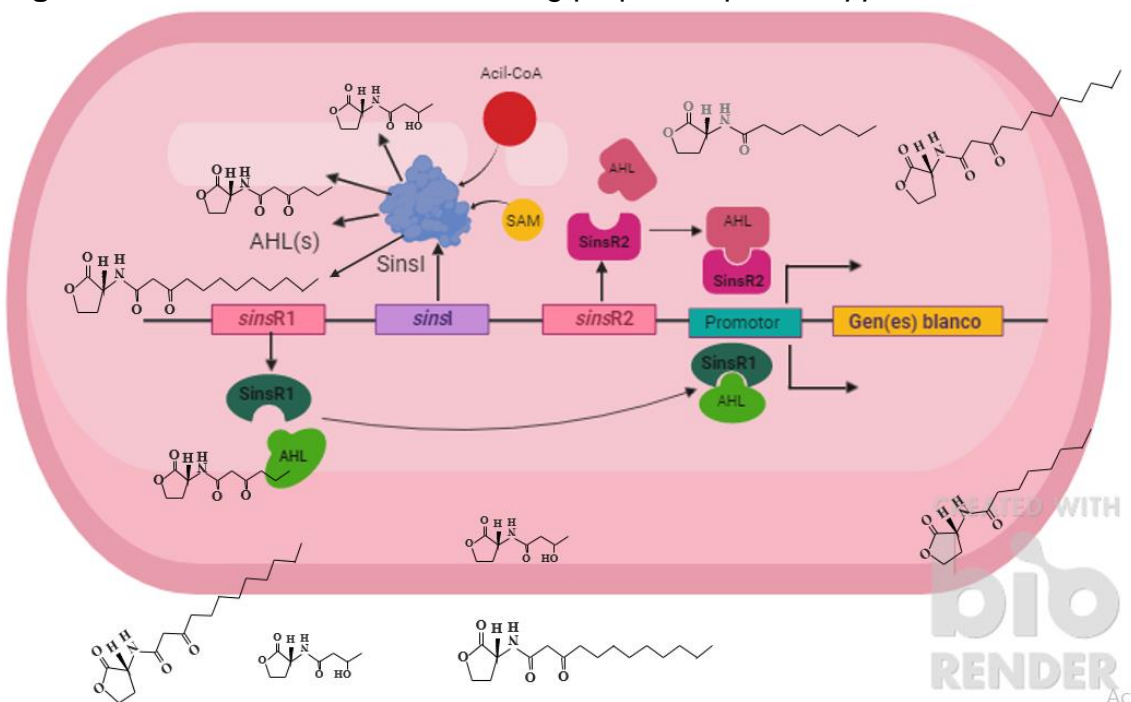
De los modelos de las cinco posibles proteínas candidatas a reguladores transcripcionales tipo LuxR, los modelos LuxR1, LuxR2 y LuxR4 de *Stappia indica*, corresponden a estructuras que son similares a reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes. Particularmente, LuxR2 y LuxR4 tienen estructuras similares a dos reguladores de respuesta que son homólogos entre sí, tal es el caso de LiaR de *Enterococcus faecium* y VraR de *Staphylococcus aureus* (Davlieva et al., 2017; Leonard et al., 2013). Hasta el momento, la única relación que existe entre FixJ, LiaR, VraR y las proteínas receptoras de moléculas señal del QS es la estructura del dominio de unión al ADN que comparten. A nivel estructural los motivos HTH de unión a ADN están bien conservados entre las bacterias, encontrándose en casi todas las proteínas reguladoras de respuesta. Por lo anterior, es también posible, que estas tres proteínas (LuxR1, LuxR2 y LuxR4) cumplan otro tipo de funciones en *Stappia indica*, no directamente relacionadas con la comunicación bacteriana.

Por otra parte, los modelos de las proteínas candidatas a reguladores de respuesta tipo LuxR de *S. indica* LuxR3 y LuxR5, fueron construidos a partir de plantillas de estructuras de proteínas que son conocidas por reconocer AHLs de cadena corta, como es el caso de CviR de *C. violaceum* (Chen et al., 2012), y proteínas que reconocen un rango más amplio de moléculas señal del QS como SdiA de *E. coli* (T. Kim et al., 2014). Si las funciones reguladas por las proteínas CviR y SdiA se conservan en las proteínas candidatas a factores de regulación transcripcional tipo LuxR de *Stappia indica*, la evidencia experimental recopilada en este trabajo de investigación podría sugerir que *Stappia indica* posee al menos dos proteínas receptoras de moléculas de señalización del QS verdaderas y que probablemente presentarían las características de sus homólogas CviR y SdiA. **Se proponen los nombres SinsR1 y SinsR2 para estas dos proteínas, respectivamente.**

Encontrar varias secuencias codificantes para posibles factores de regulación transcripcional es un indicador de la cantidad de procesos que podrían regularse por el mecanismo de comunicación bacteriana en este organismo en términos de su metabolismo y su capacidad de adaptación, pero también de procesos que se dan a nivel de grupo y que tienen implicaciones ecológicas, teniendo en cuenta los nichos de los que ha sido aislada esta bacteria.

En el presente trabajo se llevó a cabo la detección y caracterización de las AHLs producidas por cepas de *Stappia indica* y la aproximación computacional a las proteínas tipo AHL-sintasas y factores de regulación transcripcional de los sistemas tipo LuxI/LuxR presentes en el genoma de la bacteria. Con estos resultados presentamos el primer reporte de eventos de comunicación bacteriana de *Quorum Sensing* mediado por diferentes Acil Homoserín lactonas en esta bacteria y proponemos el circuito de QS (Figura 17, página 104).

Figura 17. Circuito de *Quorum Sensing* propuesto para *Stappia indica*.



El circuito de QS propuesto está conformado por una proteína AHL-sintasa, denominada SinsI que utiliza como sustratos la S-Adenosil Metionina (SAM), Acil-ACP y/o Acil-CoA como grupos transferentes de la cadena radical carbonada, diferentes moléculas de señalización que van

desde la C4 hasta la C12 AHLs y también 3-oxo-C6 y 3-oxo-C12 AHLs, y dos proteínas que actúan como reguladores transcripcionales SinsR1 y SinsR2 que responderían a las AHLs endógenas anteriormente mencionadas.

CONCLUSIONES

- ✚ Las evidencias experimentales y computacionales sugieren que *Stappia indica* se encuentra involucrada en eventos de comunicación bacteriana mediados por moléculas de señalización del *Quorum Sensing* tipo Acil-Homoserín-Lactonas. Este trabajo representa el primer reporte de este comportamiento en *S. indica* en particular y en bacterias del género *Stappia*.
- ✚ Mediante el empleo de diferentes biosensores bacterianos, con especificidades y grado sensibilidad distintos, se pudo determinar que los aislamientos bacterianos identificados como *Stappia indica* sintetizan diferentes moléculas de señalización del tipo AHLs, principalmente de los tipos C6 y C8 AHLs.
- ✚ Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de las moléculas señal, producidas por la bacteria, a través de técnicas cromatográficas, mostraron la producción de diferentes moléculas de señalización, que varían tanto en tamaño (longitud de la cadena acilo), como en las sustituciones que se dan sobre el carbono gamma de la cadena radical.
- ✚ Algunas de las moléculas señal como las C6 y C8-AHLs se producen a concentraciones relativamente altas, suficientes para ser detectadas por los biosensores bacterianos, pero otras, como la C4, 3-oxo-C6, C10, C12 y la 3-oxo-C12-AHLs, son producidas a concentraciones que sólo pueden ser detectadas a través de técnicas más sensibles como es el caso de la Cromatografía de Gases, técnica con la que, en este estudio, se detectaron hasta cinco señales más, correspondientes a moléculas tipo AHLs.
- ✚ En el desarrollo del presente trabajo se encontraron las secuencias codificantes para los dos componentes del sistema canónico de *Quorum*

Sensing de la familia LuxI/LuxR en el genoma de *Stappia indica* a través de la búsqueda dirigida. Las proteínas codificadas se caracterizaron y se encontró que contienen el dominio catalítico para la síntesis de las AHLs (para el caso de la AHL-sintasa), y los dominios de unión a ligando y de unión a ADN de las proteínas que actúan como factores de regulación transcripcional.

- ✚ El sistema de proteínas LuxI/LuxR es aquel que ha sido más ampliamente estudiado, sobre el que más se encuentra información disponible y sobre el que se halló evidencia experimental y computacional en el presente trabajo. Sin embargo, no se puede desconocer la presencia de secuencias codificantes para otros tipos de proteínas de *Quorum Sensing*, tales como aquellos sistemas que responden a otros tipos de moléculas de señalización, como el Autoinductor 2.
- ✚ En este trabajo se describen tres proteínas involucradas en el circuito de *Quorum Sensing* de *S. indica*: y se propusieron los nombres SinsI para la AHL-sintasa, y SinsR1 y SinsR2 para las proteínas receptoras.

PERSPECTIVAS

Como parte de las perspectivas y para futuros trabajos proponemos:

- ✚ La ampliación en la caracterización bioquímica de las cepas, especialmente la aplicación de pruebas bioquímicas encaminadas a la determinación de las capacidades metabólicas relacionadas con el uso de Carbono y Nitrógeno.
- ✚ En cuanto a los componentes del circuito de *Quorum Sensing* de la especie, proponemos realizar la identificación de *otros* posibles genes reguladores de este mecanismo de comunicación bacteriana, por ejemplo, los genes involucrados en la comunicación vía el AI-2, pues, pese a que no mostramos esos resultados en este trabajo, sí encontramos evidencia de la presencia de genes que codifican para sintasas y receptores de este tipo de moléculas señal en el genoma de *S. indica*.
- ✚ Además, proponemos definir cuáles de las cinco potenciales proteínas tipo LuxR encontradas en este trabajo son funcionales e identificar cuáles son los fenotipos regulados por QS en *S. indica*.
- ✚ Finalmente, sería interesante construir un biosensor basado en la cepa CCBBBdOf-5, que pueda detectar las mismas AHLs que esta cepa produce.

BIBLIOGRAFÍA

- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio*, *9*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.02331-17>
- Alagely, A., Krediet, C. J., Ritchie, K. B., & Teplitski, M. (2011). Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. *The ISME Journal*, *5*(10), 1609–1620. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.45>
- Andersen, J. B. O., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L. E. O., Geisenberger, O., Christensen, B. B., ... Givskov, M. (2001). gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(2), 575–585. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.575>
- Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Görg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., ... Eberl, L. (2003). Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology*, *5*(12), 1350–1369. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00532.x>
- Barbosa Cárdenas, A. J. (2012). *BUSQUEDA DE RELACIONES ENTRE LA COMUNICACIÓN CELULAR BACTERIANA EL POTENCIAL DE VIRULENCIA Y LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA EN LA ENFERMEDAD DE LA PLAGA BLANCA TIPO II*. Universidad Nacional de Colombia.
- Barriuso, J., & Martínez, M. J. (2018). In Silico Analysis of the Quorum Sensing Metagenome in Environmental Biofilm Samples. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01243>
- Bassler, B. L. (2002). Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, *109*(4), 421–424. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00749-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00749-3)
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., ... Zhang, J. (2017). UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, *76*(3), 111–118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Bhedi, C. D. (2017). *Quorum Sensing Signals Produced by Heterotrophic Bacteria in Black Band Disease (BBD) of Corals and Their Potential Role in BBD Pathogenesis*. Florida International University. <https://doi.org/10.25148/etd.FIDC001986>
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Biswa, P., & Doble, M. (2013). Production of acylated homoserine lactone by Gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiology Letters*, *343*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12123>
- Boone, D. R., Brenner, D. J., Castenholz, R. W., De Vos, P., Garrity, G. M., Krieg, N. R., & Goodfellow, M. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?id=yviRIumE5HgC&dq=Holt,+J.+G.+\(1994\).+Bergey's+manual+of+determinative+bacteriology+\(9th+ed.\).+Baltimore:+Williams+and+Wilkins.&source=gbs_navlink_s_s](https://books.google.com.co/books?id=yviRIumE5HgC&dq=Holt,+J.+G.+(1994).+Bergey's+manual+of+determinative+bacteriology+(9th+ed.).+Baltimore:+Williams+and+Wilkins.&source=gbs_navlink_s_s)
- Britstein, M., Devescovi, G., Handley, K. M., Malik, A., Haber, M., Saurav, K., ... Steindler, L. (2015). A NEW N-ACYL HOMOSERINE LACTONE SYNTHASE IN AN UNCULTURED SYMBIONT OF THE RED SEA SPONGE *THEONELLA SWINHOLEI*. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(December), AEM.03111-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.03111-15>
- Cárdenas, A., Rodríguez-R, L. M., Pizarro, V., Cadavid, L. F., & Arévalo-Ferro, C. (2012). Shifts in bacterial communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease.

- The ISME Journal*, 6(3), 502–512. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.123>
- Cárdenas, C., & Baena, S. (2015). Manantiales salinos: inventarios de la diversidad metabólica y filogenética de microorganismos de ambientes salinos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.*, 39(152), 358–373. <https://doi.org/10.18257/raccefy.n.199>
- Cataldi, T. R. I., Bianco, G., Frommberger, M., & Schmitt-Kopplin, P. (2004). Direct analysis of selected N-acyl-L-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(12), 1341–1344. <https://doi.org/10.1002/rcm.1480>
- Cataldi, T. R. I., Bianco, G., Palazzo, L., & Quaranta, V. (2007). Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 361(2), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.11.037>
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., & Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 11(11), 1119–1129. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1998.11.11.1119>
- Charlesworth, J., Kimyon, O., Manefield, M., & Burns, B. P. (2015). Detection and characterization of N-acyl-L-homoserine lactones using GFP-based biosensors in conjunction with thin-layer chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 118, 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.012>
- Chen, G., Swem, L. R., Swem, D. L., Stauff, D. L., Colleen, T., Loughlin, O., ... Hughson, F. M. (2012). CVIR quorum sensing. *PLoS ONE*, 7(2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.003.A>
- Christensen, Q. H., Brecht, R. M., Dudekula, D., Greenberg, E. P., & Nagarajan, R. (2014). Evolution of Acyl-Substrate Recognition by a Family of Acyl-Homoserine Lactone Synthases. *PLoS ONE*, 9(11), e112464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112464>
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., & Barton, G. J. (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, 20(3), 426–427. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg430>
- Costin, I. D. (1977). Orientierende Identifizierung obligat-und fakultativ-aerober, anspruchsloser, gramnegativer Stäbchen von medizinischem Interesse. *Med. Labor*, 30, 197–217.
- Cuadrado-Silva, C. T., Castellanos, L., Arévalo-Ferro, C., & Osorno, O. E. (2013). Detection of quorum sensing systems of bacteria isolated from fouled marine organisms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.09.010>
- Cuadrado Silva, C. T. (2009). Aislamiento de -Acilhomoserin Lactonas de Algunas Bacterias Procedentes del mar Caribe Colombiano, Como Evidencia de la Existencia de Circuitos de Quorum Sensing.
- Davlieva, M., Tovar-yanez, A., Debruler, K., Leonard, P. G., Michael, R., Arias, C. A., ... Unit, A. R. (2017). An Adaptive mutation in *Enterococcus faecium* LiaR Associated with Antimicrobial Peptide Resistance Mimics Phosphorylation and Stabilizes LiaR in an Activated State. *J Mol Biol.*, 428(22), 4503–4519. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.09.016.An>
- Díaz Sana, E. V., & Ripe Jaime, L. C. (2016). *Caracterización molecular de las comunidades bacterianas cultivables de corales sanos y con enfermedad de Banda Negra del Caribe colombiano*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Dong, S., Frane, N. D., Christensen, Q. H., Greenberg, E. P., Nagarajan, R., & Nair, S. K. (2017). Molecular basis for the substrate specificity of quorum signal synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34), 9092–9097. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705400114>
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochem.*, 20(9), 2444–2449. <https://doi.org/10.1021/bi00512a013>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Engebrecht, J., & Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(13), 4154–4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.13.4154>

- EUZÉBY, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 590–592. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>
- Ewing, W. H. ., Davis, B. R. ., & Edwards, P. R. (1960). The Decarboxylase Reactions of Enterobacteriaceae and their Value in Taxonomy. *Public Health Laboratory*, 18(4), 77–83. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19612701033>
- Fan, J., Qian, G., Chen, T., Zhao, Y., Liu, F., Walcott, R. R., & Hu, B. (2011). The acyl-homoserine lactone (AHL)-type quorum sensing system affects growth rate, swimming motility and virulence in *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0562-9>
- Farrand, S. K., Qin, Y., & Oger, P. (2002). Quorum-Sensing System of *Agrobacterium* Plasmids: Analysis and Utility. *Methods in Enzymology*, 358, 452–484. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)58108-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)58108-8)
- Fekete, A., Frommberger, M., Rothballer, M., Li, X., Englmann, M., Fekete, J., ... Schmitt-Kopplin, P. (2007, January 5). Identification of bacterial N-acylhomoserine lactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0970-8>
- Fekete, A., Kuttler, C., Rothballer, M., Hense, B. A., Fischer, D., Buddrus-Schiemann, K., ... Hartmann, A. (2010). Dynamic regulation of N-acyl-homoserine lactone production and degradation in *Pseudomonas putida* IsoF. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 22–34. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00828.x>
- Fekete, A., Rothballer, M., Hartmann, A., & Schmitt-Kopplin, P. (2010). Identification of Bacterial Autoinducers- Methods Chapter. *Bacterial Signaling*, 95–111. <https://doi.org/10.1002/9783527629237.ch6>
- Fernandez-Niño, M., Giraldo, D., Gomez-Porras, J. L., Dreyer, I., Barrios, A. F. G., & Arevalo-Ferro, C. (2017). A synthetic multi-cellular network of coupled self-sustained oscillators. *PLoS ONE*, 12(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180155>
- Fernandez, M. (2011). *Creación de un módulo sintético de comunicación bacteriana mediante redes artificiales de Quorum Sensing*. Universidad Nacional de Colombia.
- Franco, Á. (2015). *Influencia de moléculas del Quorum Sensing producidas por bacterias simbiotas de las conchas del cangrejo Pagurus longicarpus sobre larvas de Hydractinia symbiolongicarpus*. Universidad Nacional de Colombia.
- Franco, Á., Cadavid, L. F., & Ferro, C. A. (2015). Migration and Metamorphosis of a Model Cnidarian Larvae are Influenced by Bacterial Quorum Sensing Molecules Introduction Experimental, (2007), 2013.
- Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 3(September), 685–695. <https://doi.org/10.1038/nrm907>
- Fuqua, W. C., & Winans, S. C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*, 176(10), 2796–2806.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Garnier, J., Gibrat, J.-F., & Robson, B. (1996). [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. In *Methods* (Vol. 266, pp. 540–553). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)66034-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)66034-0)
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607. <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Geisenberger, O., Givskov, M., Riedel, K., Høiby, N., Tümmler, B., & Eberl, L. (2000). Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters*, 184(2), 273–278. <https://doi.org/10.1016/S0378->

1097(00)00059-8

- Ghani, N. A. b, Norizan, S. N. ur M., Chan, X. Y. ue, Yin, W. F., & Chan, K. G. (2014). Labrenzia sp. BM1: a quorum quenching bacterium that degrades N-acyl homoserine lactones via lactonase activity. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *14*(7), 11760–11769. <https://doi.org/10.3390/s140711760>
- Gould, T. A., Schweizer, H. P., & Churchill, M. E. A. (2004). Structure of the Pseudomonas aeruginosa acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Molecular Microbiology*, *53*(4), 1135–1146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04211.x>
- Gould, T. A., Watson, W. T., Choi, K. H., Schweizer, H. P., & Churchill, M. E. A. (2004). Crystallization of Pseudomonas aeruginosa AHL synthase LasI using β -turn crystal engineering. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *60*(3), 518–520. <https://doi.org/10.1107/S0907444903028300>
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS*, *30*(S1), S162–S173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, *2*(June), 60–61. <https://doi.org/10.1002/prot.24632>
- Hanzelka, B. L., & Greenberg, E. P. (1996). Quorum sensing in Vibrio fischeri : evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis . Quorum Sensing in Vibrio fischeri : Evidence that S -Adenosylmethionine Is the Amino Acid Substrate for Autoinducer Synthesis. *Journal of Bacteriology*, *178*(17), 5291–5294.
- Hanzelka, B. L., Stevens, a M., Parsek, M. R., Crone, T. J., & Greenberg, E. P. (1997). Mutation analysis of the Vibrio fischeri LuxI polypeptide:critical regions of an autoinducer synthase. *Journal of Bacteriology*, *179*(15), 4882–4887. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4882-4887.1997>
- Henao, J., Pérez, H., Abril, D., Ospina, K., Piza, A., Botero, K., ... Pinzón, A. (2017). Genome sequencing of three bacteria associated to black band disease from a Colombian reef-building coral. *Genomics Data*, *11*, 73–74. <https://doi.org/10.1016/J.GDATA.2016.12.008>
- Huang, X. (1992). A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*, *14*(1), 18–25. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(05\)80277-0](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(05)80277-0)
- Hugh, R., & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, *66*(1), 24–26.
- Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, *31*(2), 224–245. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>
- Kämpfer, P., Arun, A. B., Frischmann, A., Busse, H. J., Young, C. C., Rekha, P. D., & Chen, W. M. (2013). Stappia taiwanensis sp. nov., isolated from a coastal thermal spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(PART4), 1350–1354. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.044966-0>
- Kher, H.-L., Krishnan, T., Letchumanan, V., Hong, K.-W., How, K.-Y., Lee, L.-H., ... Chan, K.-G. (2019). Characterization of quorum sensing genes and N-acyl homoserine lactones in Citrobacter amalonaticus strain YG6. *Gene*, *684*(July 2018), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.031>
- Kim, B.-C. (2006). Stappia marina sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, *56*(1), 75–79. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63735-0>
- Kim, T., Duong, T., Wu, C., Choi, J., Lan, N., Kang, S. W., ... Kim, K. K. (2014). Structural insights into the molecular mechanism of Escherichia coli SdiA, a quorum-sensing receptor. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *70*(3), 694–707. <https://doi.org/10.1107/s1399004713032355>
- Kimura, M. (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(1), 454–458. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.454>
- Kimura, Motoo. (1980). Journal of Molecular Evolution A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol*,

16(1330), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

- King, G. M., & Weber, C. F. (2007). Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(2), 107–118. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1595>
- King Gary, M. (2003). Molecular and culture-based analyses of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7257–7265. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7257>
- Kumar, S., Costantino, V., Venturi, V., & Steindler, L. (2017). Quorum sensing inhibitors from the sea discovered using bacterial N-acyl-homoserine lactone-based biosensors. *Marine Drugs*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/md15030053>
- Lai, Q., Qiao, N., Wu, C., Sun, F., Yuan, J., & Shao, Z. (2010). *Stappia indica* sp. nov., isolated from deep seawater of the Indian Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 733–736. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.013417-0>
- Leonard, P. G., Golemi-Kotra, D., & Stock, A. M. (2013). Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* VraR activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8525–8530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302819110>
- Lerat, E., & Moran, N. A. (2004). The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in Bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 903–913. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh097>
- Li, X., Fekete, A., Englmann, M., Götz, C., Rothballer, M., Frommberger, M., ... Schmitt-Kopplin, P. (2006). Development and application of a method for the analysis of N-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1134, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.047>
- Llamas, I., Keshavan, N., & González, J. E. (2004). Use of *Sinorhizobium meliloti* as an Indicator for Specific Detection of Long-Chain N-Acyl-Homoserine Lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3715–3723. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3715>
- Logan, B. E., & Regan, J. M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 14(12), 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.10.003>
- López Fernández, J. S. (2012). *Evaluación de la influencia de la señalización celular bacteriana entre pasteurella multocida y bordetella bronchiseptica sobre cambios en el epitelio nasal de cornetes de conejo y sobre la expresión de algunos factores de virulencia*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/9853/>
- MacFaddin, J. F. (2000). Pruebas Bioquímicas Para La Identificación De Bacterias De Importancia Clínica. <https://doi.org/10.1177/1088767912461785>
- Manahan, S. E. (2000). *Environmental Chemistry. Fundamentals of environmental chemistry* (Seventh Ed). Boca Raton: Lewis Publishers. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=k01YDY2vQwoC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Environmental+Chemistry&ots=IAI1QNxUvP&sig=gopDtiR_6GsRj9H82KhoRecawOI%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=k01YDY2vQwoC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Environmental+chemistry&ots=IAI1QNx
- Mcclean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., ... Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology*, 143(1997), 3703–3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- Mellbye, B. L., Spieck, E., Bottomley, P. J., & Sayavedra-Soto, L. A. (2017). Acyl-homoserine lactone production in nitrifying bacteria of the genera *Nitrosospira*, *Nitrobacter*, and *Nitrospira* identified via a survey of putative quorum-sensing genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(22). <https://doi.org/10.1128/AEM.01540-17>
- Meyer, A., Megerle, J. A., Kuttler, C., Müller, J., Aguilar, C., Eberl, L., ... Rädler, J. O. (2012). Dynamics of AHL mediated quorum sensing under flow and non-flow conditions. *Physical Biology*, 9(2). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/9/2/026007>
- Meyer, J. L., Gunasekera, S. P., Scott, R. M., Paul, V. J., & Teplitski, M. (2016). Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by Black Band Disease cyanobacteria. *ISME Journal*, 10(5), 1204–1216. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.184>

- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- More, M., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A., & Winans, S. C. (1996). Enzymatic synthesis of a Quorum Sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*, 272(June), 1655–1658. <https://doi.org/10.1126/science.272.5268.1655>
- Morrow, K. M., Moss, A. G., Chadwick, N. E., & Liles, M. R. (2012). Bacterial associates of two caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6438–6449. <https://doi.org/10.1128/AEM.01162-12>
- Muftić, L. R., & Hunt, D. E. (2013). Victim Precipitation: Further Understanding the Linkage Between Victimization and Offending in Homicide. *Homicide Studies*, 17(3), 239–254. <https://doi.org/10.1177/1088767912461785>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 371–382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A., & Foster, K. R. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*, 6(1), 0171–0179. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060014>
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43(4), 496–518. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/396467%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC281490>
- Nilsson, P., Olofsson, A., Fagerlind, M., Fagerström, T., Rice, S., Kjelleberg, S., & Steinberg, P. (2001). Kinetics of the AHL regulatory system in a model biofilm system: How many bacteria constitute a “Quorum”? *Journal of Molecular Biology*, 309(3), 631–640. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4697>
- Or, D., Smets, B. F., Wraith, J. M., Dechesne, A., & Friedman, S. P. (2007). Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media - a review. *Advances in Water Resources*, 30(6–7), 1505–1527. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2006.05.025>
- Ortori, C. A., Dubern, J. F., Chhabra, S. R., Cámara, M., Hardie, K., Williams, P., & Barrett, D. A. (2011). Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 839–850. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4341-0>
- Osorno, O., Castellanos, L., Ramos, F. a, & Arévalo-Ferro, C. (2011). Gas Chromatography as a Tool in Quorum Sensing Studies. *Gas Chromatography - Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-biochemicals-narcotics-and-essential-oils/gas-chromatography-as-a-tool-in-quorum-sensing-studies>
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Parsek, M. R., Schaefer, A. L., & Greenberg, E. P. (2003). Analysis of random and site-directed mutations in rhlI, a Pseudomonas aeruginosa gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Molecular Microbiology*, 26(2), 301–310. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5741935.x>
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., & Iglewski, B. H. (1993). Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, 260(5111), 1127 LP – 1130. <https://doi.org/10.1126/science.8493556>
- Pomini, A. M., Araújo, W. L., & Marsaioli, A. J. (2006). Structural Elucidation and Biological Activity of Acyl-homoserine Lactones from the Phytopathogen Pantoea ananatis Serrano 1928, 1769–1778. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9108-x>
- Pommerville, J. C. (2014). *Fundamentals of Microbiology*. (Jones & Bartlett Publishers, Ed.) (Third Edit).
- Pujalte, M. J., Carmen Maclán, M., Arahal, D. R., & Garay, E. (2005). Stappia alba sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.010>
- Raina, J. B., Tapiolas, D., Willis, B. L., & Bourne, D. G. (2009). Coral-associated bacteria and their role in

- the biogeochemical cycling of sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3492–3501. <https://doi.org/10.1128/AEM.02567-08>
- Rajput, A., & Kumar, M. (2017). In silico analyses of conservational, functional and phylogenetic distribution of the LuxI and LuxR homologs in Gram-positive bacteria. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07241-5>
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., ... Eberl, L. (2001). N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*, 147(12), 3249–3262. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-12-3249>
- Romero, M., & Otero, A. (2010). Interceptación de señales de comunicación bacteriana en bacterias aisladas del medio marino. *Revista Real Academia Gallega de Ciencias*, XXIX, 129–206.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355–362. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Rosselló-Mora, R. (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6255–6257. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6255-6257.2005>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Rustigian, R., & Stuart, C. A. (1941). Decomposition of Urea by *Proteus*. *Experimental Biology and Medicine*, 47(1), 108–112. <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13054>
- Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a012427–a012427. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/citeulike-article-id:93683>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Schuster, M., Joseph Sexton, D., Diggle, S. P., & Peter Greenberg, E. (2013). Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155635>
- Sharp, K. H., Ritchie, K. B., Schupp, P. J., Ritson-Williams, R., & Paul, V. J. (2010). Bacterial acquisition in juveniles of several broadcast spawning coral species. *PLoS ONE*, 5(5), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010898>
- 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 (autoinduction signaling systems/ quorum sensing gene regulation/detection systems). *Biochemistry*, 94, 6036–6041. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20996/pdf/pq006036.pdf>
- Sidda, J. D., & Corre, C. (2012). Gamma-Butyrolactone and Furan Signaling Systems in *Streptomyces*. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 517, pp. 71–87). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404634-4.00004-8>
- Simmons, J. S. (1926). A Culture Medium for Differentiating Organisms of Typhoid-Colon Aerogenes Groups and for Isolation of Certain Fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 39(3), 209–214.
- Stackebrandt, E., & Rainey, F. A. (1995). Partial and complete 16S {rDNA} sequences, their use in generation of 16S {rDNA} phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. *Molecular {Microbial} {Ecology} {Manual}*, 2nd Edition, 1995, 3.1.1/1----17. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0351-0_18
- Steindler, L., & Venturi, V. (2007). Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x>

- Stepanov, V. G., Xiao, Y., Tran, Q., Rojas, M., Willson, R. C., Fofanov, Y., ... Roberts, D. J. (2014). The presence of nitrate dramatically changed the predominant microbial community in perchlorate degrading cultures under saline conditions. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0225-3>
- Subramoni, S., Florez Salcedo, D. V., & Suarez-Moreno, Z. R. (2015). A bioinformatic survey of distribution, conservation, and probable functions of LuxR solo regulators in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *5*(February), 16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00016>
- Sulkin, S. E., & Willett, J. C. (1940). A triple sugar-ferrous sulfate medium for use in identification of enteric organisms. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *25*(6), 649–653. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:S0022214340904905>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thiel, V., Kunze, B., Verma, P., Wagner-dçbler, I., & Schulz, S. (2009). New Structural Variants of Homoserine Lactones in Bacteria, *411007*, 1861–1868. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900126>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, *22*(22), 4673–4680.
- Toyofuku, M., Nomura, N., Fujii, T., Takaya, N., Maseda, H., Sawada, I., ... Uchiyama, H. (2007). Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, *189*(13), 4969–4972. <https://doi.org/10.1128/JB.00289-07>
- Uchino, Y., Hirata, A., Yokota, A., & Sugiyama, J. (1998). Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *A*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *44*(3), 201–210. <https://doi.org/10.2323/jgam.44.201>
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., ... Di Marco, S. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO Journal*, *21*(17), 4393–4401. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf459>
- Wang, G. I. (1985). *FEASIBILITY OF USING CATALASE ACTIVITY AS AN INDEX OF MICROBIAL LOADS ON FOOD SURFACES*. Kansas University.
- Wang, J., Quan, C., Wang, X., Zhao, P., & Fan, S. (2011). Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. *Microbial Biotechnology*, *4*(4), 479–490. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00197.x>
- Wang, W., Wang, L., & Shao, Z. (2010). Diversity and Abundance of Oil-Degrading Bacteria and Alkane Hydroxylase (alkB) Genes in the Subtropical Seawater of Xiamen Island. *Microbial Ecology*, *60*(2), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9724-4>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, *25*(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Weber, C. F., & King, G. M. (2007). Physiological, ecological, and phylogenetic characterization of *Stappia*, a marine CO-oxidizing bacterial genus. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(4), 1266–1276. <https://doi.org/10.1128/AEM.01724-06>

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/n.a>.
- Westbye, A. B., Leung, M. M., Florizone, S. M., Taylor, T. A., Johnson, J. A., Fogg, P. C., & Beatty, J. T. (2013). Phosphate concentration and the putative sensor kinase protein CckA modulate cell lysis and release of the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent. *Journal of Bacteriology*, 195(22), 5025–5040. <https://doi.org/10.1128/JB.00669-13>
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L., & Salmond, G. P. C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, 25(May). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- Whiteley, M., Lee, K. M., & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13904–13909. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13904>
- Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., J rgensen, F., Chhabra, S. R., ... Stewart, G. S. A. . (1998). Construction and analysis of luxCDABE -based plasmid sensors for investigating N -acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 163(2), 185–192. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13044.x>
- Wright, G. S. A., Saeki, A., Hikima, T., Nishizono, Y., Hisano, T., Kamaya, M., ... Sawai, H. (2018). Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system. *Science Signaling*, 11(525). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaq0825>
- Xiao, Y., Zheng, Y., Wu, S., Zhang, E. H., Chen, Z., Liang, P., ... Zhao, F. (2015). Pyrosequencing reveals a core community of anodic bacterial biofilms in bioelectrochemical systems from China. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01410>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>
- Zimmer, B. L., May, A. L., Bhedi, C. D., Dearth, S. P., Prevatte, C. W., Pratte, Z., ... Richardson, L. L. (2014). Quorum sensing signal production and microbial interactions in a polymicrobial disease of corals and the coral surface mucopolysaccharide layer. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108541>

ANEXOS

Anexo 1. Reporte de genomas en *BioProject* de NCBI (aclaración).

Bogotá, Colombia
January 13th, 2017

Dr. Jian-Bing Fan
Dr. John Quackenbush
Editors in chief
Genomics Data Journal

Dear Dr. Fan and Dr. Quackenbush,

Recently the article titled: "Genome sequencing of three bacteria associated to Black Band Disease from a Colombian reef-building coral", with reference number GDATA622, was accepted for publication in Genomics Data Journal.

Nevertheless, due to a mistake from our side, the following researchers, that collected the samples and extracted the DNA material for sequencing, were introduced in the acknowledgment section and not listed as co-authors in the paper: Laura Ripe Jaime, Erika Diaz, Catalina Arévalo-Ferro and Luis F. Cadavid.

We are aware of the implications that this situation can have in the publication and editorial processes but we'd be highly grateful if all the four aforementioned researchers can also be introduced as co-authors in the cited paper, given the importance of their contribution to this sequencing project.

I write in behalf of all the current listed authors who agree with this communication.

Thank you for your time.

Sincerely,



Andrés M. Pinzón Ph.D.
Assistant Professor
Group Leader - Bioinformatics and Systems Biology
Instituto de Genética, Off. 218
Universidad Nacional de Colombia
+57 (1) 3165000 Ext. 11618
<http://www.genetica.unal.edu.co/gibbs>

Anexo 2. Secuencias de proteínas tipo LuxI

Especies	Número de acceso	Nombre
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> 3841	CAK10388	Rhil
<i>Acidovorax citrulli</i>	ACP19742.1	Aacl
<i>Burkholderia dolosa</i>	ZP_04947583	NA
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	WP_006766153.1	XenR1
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003	YP_003910269	NA
<i>Burkholderia kururiensis</i>	CAP91066.1	Bral
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	P33883	LasI
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AAT42217.1	Pcol
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AAB95104	Tral
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	CAC46418	SinI
<i>Acidovorax citrulli</i>	WP_011796843.1	CinI
<i>Rhizobium etli</i>	WP_004672083.1	Rail
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	NP_106661	Tral
<i>Pseudomonas corrugata</i>	WP_024779116.1	Pcol
uncultured bacterium	ACH69662.1	LuxI
<i>Aliivibrio fischeri</i>	WP_005423459.1	LuxI
<i>Nitrococcus mobilis</i>	ZP_01127739	LuxI
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WP_005003452.1	PhzI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	AAC44037.1	RhII
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	CAR4099	Ccil
<i>Burkholderia ambifaria</i>	WP_00674959.1	Bvil
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	ABC34067	Btal2
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	WP_012536897.1	Afel
<i>Burkholderia glumae</i>	WP_015877501.1	Tofl
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	WP_006483943.1	CepI
<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	AAU46702	Bmal1
<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	AAU45799	Bmal3
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	ABE36319	XenI2
uncultured proteobacterium	ACH69672.1	LuxI
<i>Aeromonas hydrophila</i>	WP_005308454.1	Ahyl
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	CBG89691	Crol
<i>Serratia marcescens</i>	AAN52498.1	SpnI
<i>Pantoea stewartii</i> DC283	AAA82096.1	Esal
<i>Yersinia pestis</i> Co92	YP_00234031	Yspl
uncultured proteobacterium QS1	AAT90822.1	LuxI
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tabaci</i>	AAA82063.1	Psyl
<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	CAB92553	Smal
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CAA53693.1	YenI
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043	P33880	Carl
<i>Moritella</i> sp. PE36	ZP_01896605.1	NA
<i>Chromobacterium violaceum</i>	AAP32920.1	Cvil
<i>Desulfovibrio magneticus</i> RS-1	YP_002955226	NA
<i>Leptospirillum</i> sp. Group II	EDZ37921.1	NA

Anexo 3. Proteínas tipo LuxR

<i>Especie</i>	<i>Número de Acceso UniProt</i>	<i>Nombre</i>
<i>Vibrio harveyi</i> , <i>V. fischeri</i> , <i>V. cholerae</i>	P54300	LuxP
	P54302	LuxQ
	A7MRY4	LuxN
	B6EJH9	AinR
	Q9KM66	CQSS
	P12746	LuxR
	P25084	LasR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C6G7V0	PQSR
<i>Pseudomonas spp</i>	P54292	RhIR
	P54303	PhzR
<i>Escherichia coli</i>	P76142	LsrB
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Q6NCZ5	RpaR
	Q9KJ71	CinR
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Q84G44	BisR
	Q84G43	TraR
	Q8VM81	RaiR
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Q03316	RhiR
	P54294	TraR
<i>Erwinia, Serratia</i>	Q47188	ExpR
	P20667	CatR
<i>Pantoea stewartii</i>	P54293	EsaR
	Q9AM51	CepR
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	B4EI53	CciR
		RpfR
<i>Xanthomonas campestris</i>	P0C0F7	RpfC
<i>Burkholderia glumae</i>	Q4VSJ9	TofR
<i>Chromobacterium violaceum</i>	D3W065	CviR

Anexo 4. Tiempos de retención obtenidos por CG-FID para cada una de las muestras problema

GRUPO	MUESTRA	Tiempo de Retención (min)	GRUPO	MUESTRA	Tiempo de retención (min)	
PARAFINAS	8	2,658	CONTROL POSITIVO	Señal 1	6,797	
	9	2,788		Señal 2	9,409	
	10	3,002		Señal 3	10,101	
	11	3,336		Señal 4	11,263	
	12	3,528		Señal 5	11,46	
	13	3,833		Señal 6	12,973	
	14	4,389		Señal 7	13,065	
	15	5,006	CCBBBdOf-5	Señal 1	6,953	
	16	5,593		Señal 2	8,501	
	17	5,89		Señal 3	10,138	
	18	6,001		Señal 4	11,074	
	19	6,219		Señal 5	11,541	
	20	7,107		Señal 6	12,906	
	21	7,446		Señal 7	13,062	
	22	7,576	CCBBBdOf-9	Señal 1	6,714	
	23	7,954		Señal 2	8,524	
	24	8,004		Señal 3	10,192	
	25	8,644		Señal 4	12,954	
	26	8,745		Señal 5	13,07	
	27	8,825	CCBBBdOf-21	Señal 1	6,711	
	28	9,478		Señal 2	8,535	
	29	9,622		Señal 3	10,11	
	30	10,164		Señal 4	12,98	
	31	10,453	CCBBBdMc-11	Señal 1	6,706	
	32	10,808		Señal 2	8,532	
	33	11,187		Señal 3	10,157	
	34	11,47		Señal 4	12,927	
	35	11,87		Señal 5	13,113	
	36	12,04	CCBBhMc-3	Señal 1	6,703	
	37	12,58		Señal 2	8,499	
	38	12,704		Señal 3	10,147	
	39	13,357		Señal 4	12,91	
	40	13,447				
	PATRONES SINTÉTICOS	C4-AHL	6,826			
		C6-AHL	8,597			
		C8-AHL	10,156			
		3-oxo-C6-AHL	11,02			
		C10-AHL	11,524			
		C12-AHL	12,935			
		3-oxo-C12-AHL	13,077			

Espectro de masas de los patrones sintéticos de AHLs



- a. Cromatograma de la mezcla de patrones sintéticos; b. espectro de masas de C4-AHL; c. espectro de masas de C6-AHL; d. espectro de masas de C8-AHL; e. espectro de masas de C10-AHL; f. espectro de masas de C12-AHL