



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de las Comunidades Bacterianas de los Octocorales *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae*.

Patricia Joyce Pamela Zorro Mateus

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2011

Caracterización de las Comunidades Bacterianas de los Octocorales *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae*.

Patricia Joyce Pamela Zorro Mateus

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora:

Dr. Rer. Nat Catalina Arévalo Ferro

Línea de Investigación:

Ecología microbiana

Grupo de Investigación:

Comunicación y Comunidades Bacterianas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2011

A mis padres sin quienes no habría sido posible la realización de este trabajo.

A Rocke quién ha sido mi aliento, mi escudo y mi buen consejero en los momentos difíciles y de duda.

A mi deseo de adquirir conocimientos en biología, el cual ha quedado satisfecho con la realización de este trabajo.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis, la profesora Catalina Arévalo Ferro, por todo el conocimiento transmitido y por enseñarme a ser una persona más paciente y comprensiva. A la Profe Pato (Patricia Restrepo) por tener siempre tiempo para escucharme y aconsejarme, por hacerme reír y enseñarme que los profesores también son personas. Al profesor Luis Carlos Moreno por enseñarme la bonita labor de enseñar y por creer en mí. Al grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas, en cuyos integrantes he encontrado amigos (Nelson, Ingrid, Sandra, Ángel, Yenny, Álix, Mauricio y quienes han pasado por este grupo durante este tiempo), de quienes quiero agradecer especialmente a Annita, Topo y Migue por sus chistes, compañía y aliento. A las niñas de El Mayor (Liz y Liney) por ayudarme a construir el cepario y por acompañarme en las noches sombrías en el laboratorio. A Elkin por sus chistes y por escucharme y ayudarme. A Chez (Francy Forero) por las tardes de Oma y por ser mi amiga. A Andrés García por ser tan amable y tan bonito. A los integrantes del grupo de Inmunología Evolutiva, especialmente a Javier L, Catalina P, Alejandra Z, Henry y Rita y a su director, el profesor Luis Fernando Cadavid, por su ayuda. A la profesora Jimena y a Sandra por compartir mi sentimiento.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al grupo de Citogenética; al grupo de Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, especialmente a los profesores Carmenza Duque, Leonardo Castellanos y Freddy Ramos y a los estudiantes José Brango, Edisson Tello, Ángela Pinzón y Gicel López.

Resumen

Los compuestos inhibidores de *Quorum Sensing* suelen presentar actividad *antifouling* y antipatogénica y se han encontrado en organismos marinos libres de *macrofouling*, pero han sido poco estudiados en la comunidad bacteriana asociada con éstos. En este trabajo se estudió la comunidad bacteriana asociada con los octocorales *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae* (organismos libres de *macrofouling*) por pirosecuenciación e hibridización fluorescente *in situ* (FISH), encontrando que la mayoría de bacterias corresponden a la clase Gamma-proteobacteria y en menor proporción están Beta y Alfa-proteobacteria. Se evaluaron algunas relaciones ecológicas dentro de la comunidad de *Eunicea* sp., como la actividad inhibidora de *Quorum Sensing* y el antagonismo, encontrándolas en algunos aislamientos bacterianos. Estos aislamientos podrían estar ejerciendo un el control en la composición y la estructura de la comunidad bacteriana que mantiene a este octocoral libre de *macrofouling*.

Palabras clave: *Eunicea* sp., octocorales, FISH, pirosecuenciación, *Pseudopterogorgia elisabethae*, inhibición de *Quorum Sensing*.

Abstract

Quorum Sensing inhibitor compounds usually have antifouling and antipathogenic activities and have been found in marine organisms free of *macrofouling*. These compounds have been poorly researched in the bacterial community associated to these organisms. In this work, the bacterial communities from the octocorals *Eunicea* sp., and *Pseudopterogorgia elisabethae* were studied by pyrosequencing and fluorescent in situ hybridization (FISH), finding that bacteria are mostly from Gamma-proteobacteria class and in lower proportion, Alpha and Beta-proteobacteria. Also, different ecologic relationships in the bacterial communities of *Eunicea* sp., as Quorum Sensing inhibition and antagonism were studied and found in bacterial isolations. These isolates might play a fundamental role in controlling bacterial community structure, which results in a soft coral surface free of *macrofouling* development.

Keywords: *Eunicea* sp., octocorals, FISH, pyrosequencing, *Pseudopterogorgia elisabethae*, Quorum Sensing inhibition.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
1. Marco Teórico	5
1.1 Biofouling.....	5
1.2 Biopelículas	6
1.3 Comunicación bacteriana: <i>Quorum Sensing</i> (QS).....	9
1.4 Inhibidores de <i>Quorum Sensing</i>	12
1.5 Estrategias de inhibición de <i>Quorum Sensing</i>	15
1.6 Técnicas moleculares independientes de cultivo para la caracterización de comunidades bacterianas.....	19
1.6.1 Hibridización fluorescente <i>in situ</i> (FISH) como técnica para caracterización de comunidades bacterianas	20
1.6.1.1 CARD-FISH (catalysed reported deposition fluorescence in situ hybridization).....	23
1.6.2 Pirosecuenciación como técnica para caracterización de comunidades bacterianas.....	25
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo general.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Metodología	33
3.1 Toma, preparación de las muestras y condiciones de cultivo.....	34
3.1.1 Toma de muestras del octocoral <i>Eunicea</i> sp.....	34
3.1.1.1 Aislamiento de comunidades cultivables asociadas con el octocoral <i>Eunicea</i> sp., y purificación de cepas para pruebas de inhibición de QS	34
3.1.1.2 Preparación de la muestras del coral <i>Eunicea</i> sp., para ensayos de hibridización fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	34
3.1.1.3 Preparación de la muestras del coral <i>Eunicea</i> sp., para ensayos de pirosecuenciación.....	35
3.1.2 Preparación de la muestras del octocoral <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> para ensayos (FISH)	35
3.2 Caracterización molecular de la comunidad bacteriana asociada con los octocorales <i>Eunicea</i> sp., y <i>P. elisabethae</i>	35

3.2.1	Hibridización fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	35
3.2.1.1	Embalsamamiento de las células.....	35
3.2.1.2	Determinación de autofluorescencia de las muestras	36
3.2.1.3	Análisis <i>in situ</i> FISH en láminas.....	37
3.2.1.4	Análisis <i>in situ</i> FISH en tubos	38
3.2.1.5	Análisis <i>in situ</i> por CARD-FISH.....	38
3.2.1.6	Concentración de la muestra del octocoral <i>Eunicea sp.</i>	39
3.2.2	Análisis <i>in situ</i> por pirosecuenciación del gen ribosomal 16S RNA	40
3.2.3	Identificación de algunas bacterias aisladas de la comunidad bacteriana asociada con el octocoral <i>Eunicea sp.</i>	41
3.2.4	Detección del subgrupo <i>Antifouling</i> en la comunidad bacteriana asociada con el octocoral <i>Eunicea sp.</i>	42
3.3	Inhibición de <i>Quorum Sensing</i> y antagonismo dentro de la comunidad bacteriana asociada con el <i>Eunicea sp.</i>	42
3.3.1	Pruebas de inhibición de <i>Quorum Sensing.</i>	42
3.3.2	Pruebas de antagonismo bacteriano con algunos aislamientos de la comunidad aislada en medio LB	43
3.4	Estudio preliminar de extractos obtenidos del aislamiento ELB9, inhibidor de <i>Quorum Sensing</i>	44
3.4.1	Ensayos de crecimiento de uno de los aislamientos activos en medios de cultivo diluidos.....	44
3.4.2	Extracciones por polaridad del aislamiento ELB9, activo para inhibición de QS frente a <i>C. violaceum</i>	45
3.4.3	Ensayos de inhibición de QS con los extractos obtenidos de la extracción por polaridad del sobrenadante del aislamiento ELB9.	45
4.	Resultados	47
4.1	Caracterización molecular de la comunidad bacteriana asociada con los octocoral <i>Eunicea sp.</i> , y <i>P. elisabethae</i>	47
4.1.1	Adaptación del método de hibridización fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	47
4.1.1.1	Embalsamamiento de las células.....	47
4.1.1.2	Análisis <i>in situ</i> FISH en láminas.....	47
4.1.1.3	Determinación de autofluorescencia de las muestras	49
4.1.1.4	Análisis <i>in situ</i> FISH en tubos	51
4.1.2	Hibridización fluorescente <i>in situ</i> (FISH) para las muestras de los octocorales <i>Eunicea sp.</i> , y <i>P. elisabethae</i>	52
4.1.3	Análisis <i>in situ</i> por pirosecuenciación del gen ribosomal 16S RNA	54
4.1.4	Identificación de algunas bacterias aisladas de la comunidad bacteriana asociada con el octocoral <i>Eunicea sp.</i>	57
4.1.5	Detección del subgrupo <i>Antifouling</i> en la comunidad bacteriana asociada con el octocoral <i>Eunicea sp.</i>	60
4.2	Inhibición de <i>Quorum Sensing</i> y antagonismo dentro de la comunidad bacteriana asociada con el <i>Eunicea sp.</i>	61
4.2.1	Pruebas de inhibición de <i>Quorum Sensing.</i>	61
4.2.2	Pruebas de antagonismo bacteriano con algunos aislamientos de la comunidad aislada en medio LB	64
4.3	Estudio preliminar de extractos obtenidos del aislamiento ELB9, inhibidor de <i>Quorum Sensing</i>	66
4.3.1	Ensayos de crecimiento de uno de los aislamientos activos en medios de cultivo diluidos.....	66

4.3.2	Ensayos de inhibición de QS con los extractos obtenidos de la extracción por polaridad del sobrenadante del aislamiento ELB9.....	67
5.	Discusión.....	69
5.1	Estructura y composición de la comunidad bacteriana asociada con los octocorales <i>Eunicea</i> sp., y <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	69
5.2	Inhibición de <i>Quorum Sensing</i> y antagonismo dentro de la comunidad bacteriana asociada con el coral limpio <i>Eunicea</i> sp.....	74
6.	Conclusiones y Recomendaciones.....	79
6.1	Conclusiones	79
6.2	Recomendaciones	80
A.	Anexo: Imágenes obtenidas para FISH en <i>P. elisabethae</i>.....	81
B.	Anexo: Abundancia relativa de las clases Alfa, Beta y Gamma-proteobacteria asociadas con el octocoral <i>Eunicea</i> sp	85
C.	Anexo: Caracterización bioquímica y por secuenciación del gen 16S rARN de algunos aislamientos	87
	Bibliografía	91

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura de algunas moléculas señal de QS.	10
Figura 1-2: Sistemas de <i>Quorum Sensing</i> (QS).	11
Figura 1-3: Esquema general del procedimiento usado en la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) para la identificación filogenética de microorganismos.	21
Figura 1-4: Principio de la técnica CARD-FISH.	25
Figura 1-5: Procedimiento general de la técnica de pirosecuenciación.	27
Figura 1-6: Reacciones involucradas en pirosecuenciación.	28
Figura 3-1: Representación de la siembra de los aislamientos para las pruebas de antagonismo.	44
Figura 4-1: Embalsamamiento de un cultivo de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> de 16 horas de incubación en 4 soluciones fijadoras diferentes.	48
Figura 4-2: Autofluorescencia de las muestras de <i>P. elisabethae</i> y <i>Eunicea</i> sp.	50
Figura 4-3: FISH empleando la sonda para Eubacteria y para Alfa-proteobacteria, sobre muestras de <i>P. elisabethae</i> y <i>Eunicea</i> sp.	51
Figura 4-4: FISH sobre una muestra concentrada del octocoral <i>Eunicea</i> sp., empleando sondas para Eubacteria, Alfa y Gamma-proteobacteria.	53
Figura 4-5: Abundancia relativa de clases bacterianas asociadas al octocoral <i>P. elisabethae</i>	54
Figura 4-6: FISH sobre una muestra del material suspendido del octocoral <i>P. elisabethae</i> , empleando sondas para Eubacteria, Alfa, Gamma y Beta-proteobacteria.	55
Figura 4-7: Curva de rarefacción.	56
Figura 4-8: Abundancia relativa de phyla bacterianos asociados con el octocoral <i>Eunicea</i> sp.	56
Figura 4-9: Abundancia relativa de proteobacterias asociadas al octocoral <i>Eunicea</i> sp.	57
Figura 4-10: Dendograma construido a partir de las secuencias del gen ribosomal 16S.	58
Figura 4-11: Gel de electroforesis del producto de PCR del grupo <i>Antifouling</i>	61
Figura 4-12: Prueba de inhibición de QS para la comunidad bacteriana aislada en el medio de cultivo LB.	62
Figura 4-13: Prueba de inhibición de QS para algunos aislamientos bacterianos de la comunidad cultivada en LB.	63

Figura 4-14: Prueba de antagonismo para algunos aislamientos bacterianos de la comunidad cultivada en LB	65
Figura 4-15: Curvas de variación del crecimiento del aislamiento ELB9	66
Figura 4-16: Prueba de inhibición de QS para los extractos con actividad del sobrenadante del medio de cultivo del aislamiento ELB9	68
Figura A-1: Muestra de imágenes obtenidas para FISH con sondas para Eubacteria y Alfa-proteobacteria	81
Figura A-2: Muestra de imágenes obtenidas para FISH con sondas para Eubacteria y Gamma-proteobacteria	82
Figura A-3: Muestra de imágenes obtenidas para FISH con sondas para Eubacteria y Beta-proteobacteria	83
Figura B-1: Abundancia relativa de la clase Gamma-proteobacteria asociadas con el octocoral <i>Eunicea</i> sp.	85
Figura B-2: Abundancia relativa de la clase Alfa-proteobacterias asociadas con el octocoral <i>Eunicea</i> sp.	86
Figura B-3: Abundancia relativa de la clase Beta-proteobacterias asociadas con el octocoral <i>Eunicea</i> sp.	86
Figura C-1: Muestra de un fluorograma obtenido para una parte de la secuenciación del gen ribosomal 16S para uno de los aislamientos.	87
Figura C-2: Muestra de un alineamiento hecho en el programa ClustalX, empleando para construir el dendograma mostrado en la figura 4-10.	88

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Moléculas señal de QS y fenotipos controlados por éstas, en bacterias marinas y potencialmente patógenas.	11
Tabla 1-2: Moléculas encontradas en la naturaleza, con acción inhibidora de QS.	18
Tabla 3-1: Moléculas encontradas en la naturaleza, con acción inhibidora de QS.	40
Tabla 4-1: Morfología, distancia p y porcentaje de similitud para trece bacterias aisladas del octocoral <i>Eunicea</i> sp.....	59
Tabla 4-2: Clasificación cualitativa de la prueba de inhibición de QS de los aislamientos bacterianos obtenidos de la comunidad aislada en LB.....	63
Tabla 4-3: Resultados para la prueba de antagonismo de las bacterias aisladas del octocoral <i>Eunicea</i> sp.	64
Tabla A-1: Conteos de pixeles para las sondas hibridizadas mediante FISH para la muestra del material suspendido en el medio de embalsamamiento del octocoral <i>P. elisabethae</i>	84
Tabla C-1: Información sobre las secuencias empleadas para la construcción del dendograma mostrado en la figura 4-10.....	89
Tabla C-2: Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a algunos aislamientos del octocoral <i>Eunicea</i> sp.....	90

Introducción

La mayoría de organismos mantienen asociaciones mutualistas con otros, que se consideran sus huéspedes. En el caso de los organismos marinos estas asociaciones han sido bien reconocidas entre peces, moluscos, crustáceos, y muchos otros que incluyen bacterias, virus, y hongos. Todo el conjunto se conoce como holobionte, este término hace referencia al hospedero y a todos sus simbioses pertenecientes a los tres dominios de la vida: Eukarya, Bacteria, y Archaea y a las relaciones dinámicas entre ellos (Rosenberg *et al.* 2007), la pérdida de alguno de estos organismos compromete el equilibrio ecológico que existe en el sistema. Los organismos que cuentan con una gran variedad de simbioses asociados han sido objeto de estudio, definiéndose en áreas afines a la ecología química, el fenómeno del *biofouling* que es la asociación natural de micro y macroorganismos a una superficie que se encuentra sumergida. Su formación empieza con el acondicionamiento de la superficie, en la que se forma una capa compuesta por proteínas, polisacáridos y proteoglicano, que constituye una superficie pegajosa a la cual se pueden adherir en un paso posterior bacterias y microalgas. La colonización de la superficie por microorganismos se lleva a cabo en dos pasos, el primero es una adsorción reversible y el segundo es una adhesión irreversible. La adsorción bacteriana ocurre principalmente por interacciones físicas de las células planctónicas con la superficie, tales como fuerzas de van der Waals, movimientos Brownianos, interacciones electrostáticas, el flujo del agua y la gravedad. Posteriormente, las bacterias usan polímeros extracelulares para adherirse temporalmente a la superficie. La biopelícula se forma cuando la comunidad bacteriana secreta más exopolisacárido (EPS), esta biopelícula es una comunidad altamente organizada, constituida por varias especies. El cambio fenotípico entre los pasos reversibles e irreversibles lleva a la maduración de la biopelícula, este cambio es dependiente de la densidad celular y es llevado a cabo por medio de un sistema conocido como *Quorum Sensing* (QS) (Fuqua *et al.* 1994; Cao *et al.* 2010). Después de la maduración de las biopelículas sucede una segunda colonización de la superficie la cual es llevada a cabo por esporas de

macroalgas y protozoos, finalmente la superficie es colonizada por larvas de macroorganismos (Cao *et al.* 2010).

Las biopelículas no solo se establecen en medios marinos, de hecho son la forma predominante de colonización bacteriana en la naturaleza, sin embargo muchas veces potencian las enfermedades y aíslan a los microorganismos en una matriz protectora en la que se difunden los antibióticos reduciendo su concentración mínima inhibitoria. De acuerdo con un anuncio público de US National Institute of Health más del 80% de todas las infecciones bacterianas involucran la formación de biopelículas (Rasmussen & Givskov 2006b), sin embargo su formación no sólo es un problema a nivel de la salud humana y animal sino también a nivel industrial, debido a que ésta media la formación de *biofouling*. Las técnicas de eliminación del *fouling* normalmente incluyen pinturas que son tóxicas por su alto contenido de metales pesados o diferentes técnicas de lavado con agua a presión, lejía, raspado, etc., las cuales son costosas y consumen mucho tiempo (Portillo 2002).

Aunque existen técnicas mecánicas y químicas para retirar el *biofouling* de las superficies, nombradas en el párrafo anterior, también existen varios ejemplos en la naturaleza, en los que los organismos son capaces de controlar el desarrollo del *biofouling* por medio de la síntesis de sustancias que inhiben el QS. Un ejemplo es el de la macroalga *Delissea pulchra*, que controla el *biofouling* en su superficie por medio de la producción de una furanona halogenada que se asemeja a las acil homoserín lactonas (AHLs) usadas como moléculas señal por las bacterias Gram negativas. Así, *D. pulchra*, inhibe el QS y en consecuencia controla la maduración de la biopelícula, que es uno de los primeros pasos en la conformación del *biofouling* (Ren & Wood 2004; Suga & Smith 2003). Otro ejemplo es la interacción directa entre un organismo eucariote y la bacteria *Pseudoalteromonas tunicata*, que sintetiza sustancias pigmentadas para bloquear la formación de biopelículas de algunas especies bacterianas inhibiendo el control transcripcional dependiente de AHL de una forma similar a la de las furanonas. La interacción con esta bacteria epifítica le permite también al alga verde *Ulva lactuca* mantenerse limpia sin desarrollar *macrofouling* en su superficie (Egan *et al.* 2000; Rao *et al.* 2006; Rao *et al.* 2007).

El octocoral *Eunicea* sp., es un organismo marino limpio, es decir no tiene *macrofouling* desarrollado sobre su superficie, esta característica puede estar regulada mediante

compuestos sintetizados por el octocoral o por las comunidades bacterianas asociadas con éste. El papel de estos compuestos puede ser controlar la comunicación entre la comunidad bacteriana (inhibición de QS) evitando la expresión de fenotipos que requieren de una densidad celular mínima, estos compuestos también pueden ser responsables del antagonismo entre algunas de las poblaciones bacterianas que componen la comunidad o podrían inhibir o inducir el crecimiento de algunas especies bacterianas. El efecto que estos compuestos tienen sobre la comunidad bacteriana daría como resultado final el control de las poblaciones que la conforman.

El objetivo principal de este trabajo fue observar si las comunidades bacterianas asociadas al octocoral *Eunicea* sp., pueden ser las posibles responsables de que no se desarrollen las últimas etapas del *biofouling*. Para conocer la estructura de las comunidades bacterianas de organismos libres de *macrofouling* se escogieron los octocorales *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae*, la composición de sus comunidades se determinó mediante métodos independientes de cultivo como hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en el caso de *P. elisabethae* y pirosecuenciación en el caso de *Eunicea* sp., encontrando que la mayoría de bacterias asociadas con estos corales pertenecen a la clase Gamma-proteobacteria y en una proporción menor se encuentran Alfa y Beta-proteobacteria. También, estudiamos la comunidad bacteriana cultivable asociada con el octocoral *Eunicea* sp., y encontramos que 13 cepas bacterianas bloquean la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, la cual es regulada por QS. Estos aislamientos pueden sintetizar compuestos que inhiben QS y de esta forma controlan la estructura de la comunidad bacteriana asociada con el octocoral, este mecanismo junto con el antagonismo observado también entre algunos de los aislamientos, pueden ser una de las razones por las que *Eunicea* sp., no presenta desarrollo de *macrofouling* sobre su superficie. Los aislamientos bacterianos con actividad inhibidora de QS fueron caracterizados macro y microscópicamente y también molecularmente por secuenciación del gen ribosomal 16S. Con esta caracterización se encontró que gran parte pertenecen a la especie *Alcaligenes faecalis*, de la que no se encuentran reportes en la literatura sobre actividad inhibidora de *Quorum Sensing*. También se encontraron aislamientos del género *Vibrio* y de las especies *Microbacterium maritropicum*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Bacillus fusiformis*, cuya actividad inhibidora de QS es menos marcada que la presentada por *A. faecalis*. Sobre estas últimas especies, solo se ha reportado en la literatura actividad inhibidora de QS

para el género *Bacillus*. En este trabajo se obtuvo también una colección de cepas asociadas con éste octocoral, la cual cuenta con 92 ejemplares, que se encuentran a disposición de la comunidad científica.

1. Marco Teórico

1.1 *Biofouling*

La mayoría de invertebrados marinos y algas empiezan su vida como organismos microscópicos que necesitan dispersarse y colonizar las superficies que estén disponibles. Estas larvas compiten por el espacio con procariontas, protistas y larvas de animales invertebrados, para convertirse en adultos que deben mantener sus propias superficies limpias. La epibiosis y el *biofouling* son definidas como la acumulación de microorganismos, plantas, algas y animales en superficies húmedas (Wahl 1989; Fusetani & Clare 2006). Éste es un proceso natural mediante el cual se distribuye la materia orgánica y los nutrientes a través de la columna de agua. Lo anterior puede representar un problema para los organismos sésiles, como los corales, ya que la misma corriente de agua que los supe de comida transporta una gran cantidad de propágulos que buscan una superficie a la cual adherirse. Por lo anterior las larvas han encontrado mecanismos para hallar, explorar y adherirse a los sustratos disponibles, mientras que los organismos adultos sésiles han desarrollado estrategias que impidan su colonización (Fusetani & Clare 2006).

La formación de *biofouling* marino ocurre en cuatro pasos secuenciales, los primeros dos pasos llevan a la formación de una biopelícula microbiana, la cual ocurre de una forma similar en superficies marinas o en otras superficies externas al mar, como por ejemplo en un catéter, los dientes o en un intercambiador de calor industrial. Los dos pasos posteriores son únicos de hábitats acuáticos e incluyen la adhesión de eucariotas unicelulares y multicelulares a una superficie inorgánica o viva. La formación de *biofouling* inicia con la adsorción de material inorgánico y macromoléculas orgánicas en superficies sumergidas, tales como proteínas, polisacáridos y proteoglicanos, este paso se lleva a cabo en aproximadamente un minuto y resulta en una superficie mucho más pegajosa a la que se pueden adherir microorganismos (Callow & Fletcher 1994; Cao *et al.* 2010). El segundo paso comprende una colonización de la superficie por procariontas y

el posterior desarrollo de una biopelícula bacteriana madura. El tercer paso es una segunda colonización de eucariotas unicelulares, que incluye organismos fotosintéticos, zooplancton y depredadores, este paso inicia días después de la inmersión y sigue hasta que la comunidad microbiana cubre la superficie. El paso final es la unión de propágulos de organismos multicelulares, larvas de invertebrados y esporas de algas. Así se constituye una comunidad inicial de macroorganismos a la que posteriormente se le da forma por medio de procesos ecológicos como la competencia, depredación y sucesión (Delort *et al.* 2000; Fusetani & Clare 2006; Qian *et al.* 2007).

1.2 Biopelículas

En 1935 Zobell y Allen fueron los primeros en observar que los asentamientos de larvas de invertebrados eran mejorados por una delgada capa de agregados microbianos presentes en sustratos artificiales (Zobell & Allen 1935), estos agregados conocidos como biopelículas son ubicuos en las superficies acuáticas y están compuestos por bacterias, diatomeas, hongos, algas unicelulares y protozoos. Entre los primeros colonizadores de las superficies sumergidas están las bacterias por lo que ellas constituyen la primera superficie de contacto para el resto de colonizadores (Qian *et al.* 2007) . La formación de biopelículas bacterianas es un proceso de desarrollo en el cual las bacterias sufren un cambio de estilo de vida regulado, pasan de un estado unicelular nómada (planctónico) a un estado multicelular sedentario (biopelícula) en el que su crecimiento resulta en comunidades estructuradas y diferenciación celular (Lemon *et al.* 2008) .

La gran mayoría de biopelículas encontradas en la naturaleza son comunidades microbianas multi-especies (Kolter 2005) , en las que se hospedan bacterias que permanecen con el propósito de mantener la comunidad, comparten su material genético en un alto porcentaje y se diferencian en distintos nichos dentro de la biopelícula (Watnick & Kolter 2000) . Para que estas estructuras se formen, una bacteria debe asociarse a la superficie seleccionando un lugar para arraigarse, transitoriamente en las primeras etapas, cuando las condiciones le permiten establecerse forma una asociación estable e irreversible, la cual lleva a cambios en la expresión genética que transforman a esta célula de planctónica a sésil. A partir de este punto se asocia con células de su misma especie o de otras que tengan un metabolismo compartido o complementario,

posteriormente la biopelícula madura y se observan las estructuras tridimensionales en forma de hongos con canales interiores para la circulación de nutrientes, la proximidad de las células en la matriz facilitan el intercambio de moléculas señalizadoras que intervienen en la expresión de fenotipos compartidos. En esta etapa juega un papel fundamental el fenómeno del *Quorum Sensing* (QS) en el que se regula la expresión genética según la densidad poblacional de las bacterias. Finalmente la biopelícula se dispersa mediante varios procesos entre los que se incluye el *swarming*, *gliding* o *twitching* y el desprendimiento de cúmulos o la lisis intraestructural del exopolisacárido (EPS) (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

Generalmente, se asume que las actividades fisiológicas bacterianas en un cultivo planctónico homogéneo son uniformes, sin embargo en el ambiente local de una biopelícula, a través de la transcriptómica y la proteómica, se ha visto que las condiciones ambientales y las respuestas fisiológicas de las bacterias no son homogéneas. La actividad metabólica de las células y los procesos de difusión llevan a gradientes de concentración de nutrientes, las células se adaptan a las condiciones químicas locales que pueden cambiar a través del desarrollo de la biopelícula. Por lo tanto las células que crecen en una biopelícula son fisiológicamente diferentes a sus pares planctónicos y a las células que las rodean dentro de la misma. Así, la tasa local de producción y consumo de un soluto dependerá de la organización espacial de los microorganismos que lo metabolizan (Stewart & Franklin 2008). Uno de los cambios más notorios que sufren las bacterias dentro de una biopelícula es la producción de EPS, el cual funciona principalmente como un pegamento para adherir las células al sustrato y formar una matriz intracelular entre ellas, esta matriz también atrapa y absorbe nutrientes. El exopolisacárido producido por células bacterianas varía en composición, algunos polímeros son neutros pero la mayoría son polisacáridos polianiónicos (Qian *et al.* 2007).

La continuidad de una biopelícula puede ser influenciada por un número de eventos fisiológicos y biológicos iniciados por los primeros colonizadores, así como también por la modificación de propiedades fisiológicas y bioquímicas de la superficie, las cuales determinan las especies de bacterias que serán los segundos colonizadores. Interacciones sinérgicas, antagonistas y/o competitivas entre colonizadores junto con la llegada de nuevos y/o pérdida de previos colonizadores, continuamente le dan forma a la comunidad en la biopelícula. La continuidad está también influenciada por condiciones físicas y químicas del ambiente externo, por ejemplo los microorganismos que son

capaces de adherirse rápidamente tienen una ventaja selectiva en corrientes turbulentas. Además, la concentración de nutrientes en la fase acuosa determina el número, tipo, y estado metabólico de los microorganismos planctónicos disponibles en la superficie, así como también la tendencia de los microorganismos a adherirse a la superficie y convertirse en parte de la comunidad de la biopelícula. Por otro lado las bacterias dentro de la biopelícula también tienen la habilidad de desunirse cuando las condiciones ambientales se vuelven poco favorables para éstas (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

La habilidad de las bacterias para formar comunidades es crucial en el desarrollo de algunas enfermedades infecciosas. De hecho las biopelículas causan infecciones persistentes como infecciones crónicas del oído medio, de los huesos, de válvulas cardíacas y otras relacionadas con dispositivos médicos implantados. Así mismo las interacciones entre las poblaciones bacterianas que conforman una comunidad son responsables de la intensidad de infecciones como la fibrosis quística y al parecer de algunas infecciones crónicas del tracto urinario. Las biopelículas son responsables de la caries dental y comúnmente están asociadas a enfermedades nosocomiales. Los medicamentos disponibles para tratar infecciones son antibióticos que han sido desarrollados para matar o detener el crecimiento de células bacterianas individuales, sin tener en cuenta que la mayoría de las veces las bacterias se encuentran formando biopelículas, en las que algunas de las células tienen tasas de división muy bajas o mecanismos que no son típicos de los blancos farmacéuticos para los que se han diseñado los antibióticos. Además, las dosis determinadas para alcanzar la concentración mínima inhibitoria (CMI) no son efectivas contra infecciones causadas por biopelículas bacterianas (Greenberg 2003; Rasmussen & Givskov 2006a).

A nivel industrial las biopelículas bacterianas también causan problemas, pues estas pueden reducir la transferencia de calor en intercambiadores de calor y torres de enfriamiento, descomponer membranas de ósmosis reversa, corroer superficies metálicas y contaminar equipos de procesamiento de comidas. Así como las biopelículas son resistentes a los antibióticos, también lo son a las sustancias químicas antibacterianas usadas para combatir las bacterias planctónicas (Morikawa 2006; Barczak & Hung 2009).

1.3 Comunicación bacteriana: *Quorum Sensing* (QS)

Las biopelículas son comunidades en las que las bacterias se comunican por medio de señales químicas para coordinar actividades en comunidad, esta comunicación bacteriana es conocida como quorum sensing (QS) y es definida como la regulación de la expresión genética en respuesta a la fluctuación en densidad de población (Fuqua *et al.* 1994). Las bacterias controlan la expresión de una gran variedad de fenotipos por QS, como por ejemplo la síntesis de factores de virulencia, de pigmentos, de bioluminiscencia, la motilidad, la comunicación con el sistema inmune del hospedero y la maduración de las biopelículas (Diggle *et al.* 2007). En este último proceso, el QS es responsable del desarrollo de la biopelícula, de la estructura microbiana que ésta tenga y de la forma en la que los microorganismos individuales la dispersen (Kjelleberg & Molin 2002).

En las bacterias Gram negativas los sistemas de QS están regulados generalmente por una molécula señal que se difunde libremente en el medio, una acil-homoserina lactona cuya especificidad depende de su sustituyente en R y de la longitud de la cadena carbonada. Su estructura general se muestra en la figura 1-1, esta molécula es producida por una sintetasa y cuando su concentración llega a un límite se une de forma estable a un receptor de respuesta o factor de transcripción, esta interacción desenmascara el dominio de unión del receptor de respuesta al ADN, permitiéndole unirse al promotor del operón en el que se encuentran los genes cuya expresión es controlada por QS. El sistema de QS para bacterias Gram negativas se muestra en la Figura 1-2a.

En las bacterias Gram positivas la molécula señal es un péptido que se sintetiza al interior de la célula y es secretado por medio de un transportador del tipo ABC, ejemplos de las estructuras de estos péptidos se muestran en la figura 1-1. Cuando la concentración del péptido señal al exterior de la célula llega a un límite, éste es detectado por un sistema de dos componentes que termina en la expresión del gen o los genes controlados por QS (Miller & Bassler 2001). El sistema de QS para las bacterias Gram positivas se muestra en la figura 1-2b.

También existe un sistema de comunicación bacteriana inter-especies, en el que la molécula señal se conocen como autoinductor-2 (AI-2). Esta molécula es un borato llamado S-THMF-borato (3A-metil-5,6-dihidro-furo(2,3-D)(1,3,2)dioxaborol-2,2,6,6A-

tetraol), es detectada por un sistema de dos componentes tanto en bacterias Gram positivas como en bacterias Gram negativas y se ha visto que su actividad no está siempre asociada con el boro (Dong *et al.* 2007). En general el término autoinductor-2 ha sido empleado para referirse a moléculas señal que se sintetizan a partir del precursor 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD), otros ejemplos de este grupo de moléculas son el AI-2 encontrado en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (2*R*,4*S*)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidrofurano (*R*-THMF) (Vendeville *et al.* 2005) y 4-hidroxi-5-metil-3(2*H*)-furanona (MHF) (Tavender *et al.* 2008), la cual produce una bioluminiscencia moderada en *Vibrio harveyi* en ensayos *in vitro*. Las estructuras de estas moléculas señal se muestran en la figura 1-1.

En la tabla 1-1, se muestran algunas moléculas señal para bacterias Gram negativas, Gram positivas e interespecies, muchas de estas moléculas señal pertenecen a bacterias marinas y potenciales patógenas.

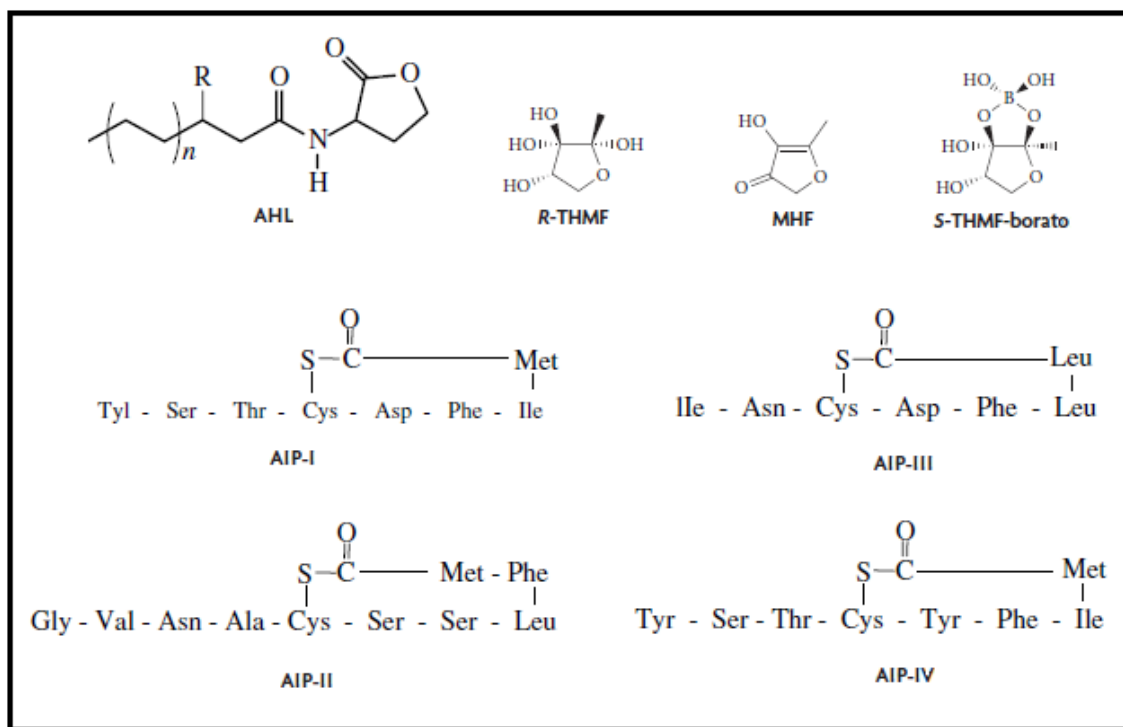


Figura 1-1: Estructura de algunas moléculas señal de QS. Estructura general de las acil homoserín lactonas (AHL), usadas como molécula señal del QS por las bacterias Gram negativas, estructura de las dos moléculas señal interespecies conocidas hasta el momento (S-THMF.borato y R-THMF) y estructura de los 4 oligopéptidos cíclicos

encontrados como moléculas señal de QS en bacterias Gram positiva de la especie *Staphylococcus aureus* (Dong *et al.* 2007).

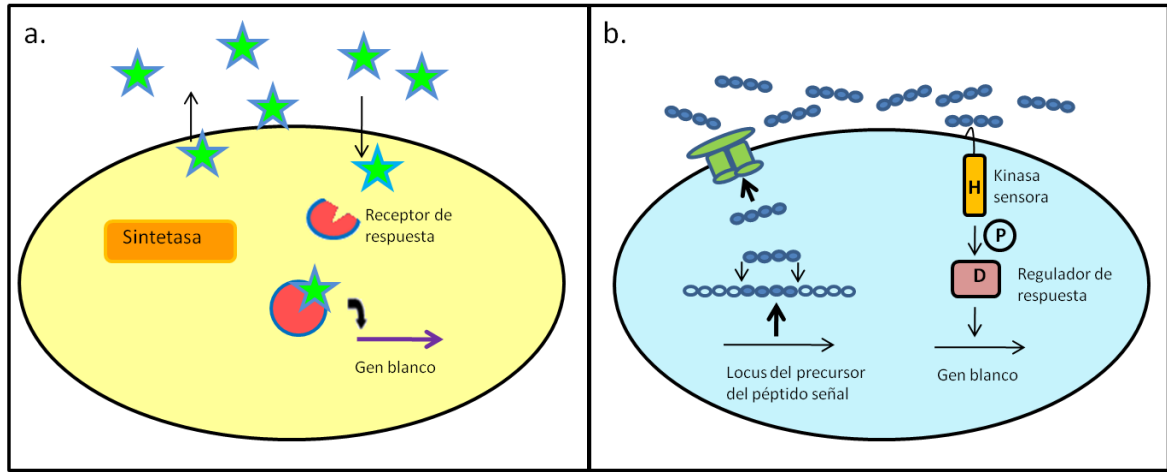


Figura 1-2: Sistemas de *Quorum Sensing* (QS). **a.** para bacterias Gram negativas, **b.** para bacterias Gram positivas.

Tabla 1-1: Moléculas señal de QS y fenotipos controlados por éstas, en bacterias marinas y potencialmente patógenas (Dobretsov *et al.* 2009).

Señal de QS	Bacteria	Sintetasa de la molécula señal	Proceso controlado por QS
N-acil homoserina lactonas			
3-oxo-C6-HSL	<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI	Producción de luz
3-oxo-C10-HSL	<i>Vibrio anguillarum</i>	VanI	Virulencia
3OH-C4-HSL	<i>Vibrio harveyi</i>	LuxM	Bioluminiscencia
C4-HLS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RhII	Maduración de biopelículas y adhesión
3-oxo-C12-HSL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI	Virulencia
3-oxo-C8-HSL	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tral	Transferencia por conjugación del piasmido de virulencia
C4-HLS, C6-HLS	<i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>A. salmonicida</i>	Ahyl, Asal	Maduración de biopelículas y producción de enzimas
C6-HLS	<i>Chromobacterium violaceum</i>	CvI	Producción de violaceína, antibióticos y enzimas
C4-HLS	<i>Serratia marcescens</i>	SwrI	Motilidad por "Swarming"
C6-HLS, 3-oxo-C6-HSL, C8-HLS	<i>Yersinia enterocolytica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Yen I, YpsI	Motilidad y agregación
C6-HLS, C8-HLS	<i>Roseobacter</i> spp., <i>Marinobacter</i> sp.	?	?

Tabla 1-1: (Continuación)

C6-HLS, 3-oxo-C6-HSL	<i>Vibrio</i> sp. asociado a esponjas	?	?
AHLs	<i>Siliciobacter-Ruegeria</i>	?	?
C12-HLS, C6-HLS	<i>Vibrio alginolyticus</i>	?	?
Oligopéptidos			
Tiolactona grupo I	<i>Staphylococcus aureus</i>	AIP-I	Virulencia
Tiolactona cíclica	<i>Staphylococcus aureus</i>	AIP-II	Virulencia
Tiolactona grupo III	<i>Staphylococcus aureus</i>	AIP-III	Virulencia
Tiolactona grupo IV	<i>Staphylococcus aureus</i>	AIP-IV	Virulencia
ADPITRQWGD	<i>Bacillus subtilis</i>	CSF	Competencia y esporulación
ERGMT	<i>Bacillus subtilis</i>	CSP	Competencia
γ-butirolactonas	<i>Streptomyces griseus</i>	Factor A	Biosíntesis de antibióticos
Dicetopiperazinas (DKP), Ciclo(Ala-1-Val) y Ciclo(1-Pro-1-Tyr)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	No hay evidencia de síntesis enzimática de DKP por estas bacterias	Comunicación interespecies
Ciclo(1-Phe-1-Pro)	<i>Pseudomonas fluorescense</i> , <i>Pseudomonas alcaligenes</i>		
Ácidos			
Éster metílico del ácido hidroxipalmitico	<i>Ralstonia solanacearum</i>	PhcS-PhcR	Producción de polisacáridos (factores de virulencia)
Ácido Cis-11-metil-2-dodecanoico	<i>Xanthomonas campestris</i>	?	Virulencia
Interespecies (AI-2)			
Furanosil diéster borato	<i>Vibrio harveyii</i>	AI-2 (LuxS)	Luminiscencia
señal no identificada CAI-1	<i>V. cholerae</i> , <i>V. harveyii</i>		Virulencia
	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i>	CQSA	Virulencia
(2R, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxtetrahidrofurano	<i>Salmonella enterica</i> SV <i>Typhimurum</i>	AI-2 (LuxS)	Virulencia

1.4 Inhibidores de *Quorum Sensing*

El control de infecciones bacterianas por medio de la inhibición del crecimiento microbiano ha sido una forma de combatir las infecciones, así varias clases de antibióticos como penicilinas y sulfonamidas son comúnmente usadas y casi siempre son tóxicas para los microorganismos que se combaten. El uso indiscriminado de antibióticos

ha causado la selección de bacterias resistentes con más altos niveles de tolerancia a un gran espectro de antibióticos. De acuerdo con un anuncio público de US National Institute of Health más del 80% de todas las infecciones bacterianas involucran la formación de biopelículas (Rasmussen & Givskov 2006b).

La inhibición de *Quorum Sensing* es un mecanismo de control de crecimiento natural utilizado por organismos que se ven afectados por la formación de biopelículas. El QS también regula la virulencia en algunos patógenos de plantas y humanos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Erwinia carotovora* entre muchas otras bacterias. La interrupción del QS o comunicación bacteriana disminuye la virulencia y además limita la presión selectiva hacia la resistencia, lo que la hace una estrategia ventajosa como una ayuda para combatir infecciones causadas por bacterias, dirigiéndose a un blanco antipatogénico y no bactericida.

La inhibición de QS es usada por una gran cantidad de organismos procariontes y eucariontes. Por ejemplo, algunas cepas de *S. aureus* producen moléculas señal que funcionan para sus propios mecanismos de comunicación pero que inhiben el de otras cepas. Algunas especies de *Bacillus* producen una enzima acil-homoserina lactonasa que inactiva la actividad de las acil-homoserina lactonas (AHL) hidrolizando el enlace lactona de las AHLs producidas por otras especies. Lo anterior es posiblemente una forma de evitar la competencia con otros microorganismos por un lugar para colonizar. También se sabe que algunas líneas celulares humanas inactivan las moléculas señal del QS (Rasmussen & Givskov 2006b).

El ambiente del hospedero también modula el QS en diversas poblaciones bacterianas a través de la destrucción enzimática o no enzimática de las AHLs por lactonólisis, por ejemplo, las para-oxoninas de los mamíferos (PON1, PON2, PON3) son una familia única de hidrolasas dependientes de calcio y aunque sus sustratos no sean conocidos aún, éstas poseen actividad enzimática frente a un amplio rango de sustratos incluyendo AHLs. Se ha reportado que las moscas de *Drosophila* transgénica pueden protegerse de *P. aeruginosa* expresando la para-oxonina PON1 de humanos (Williams & Cámara 2009). Otro ejemplo del control que ejerce el hospedero sobre el QS de poblaciones bacterianas se ha visto en los organismos marinos y acuáticos en general, los cuales suelen vivir en ambientes donde el *biofouling* es común, por lo cual deben tolerar, controlar o combatir la *epibiosis* debido a las desventajas que ésta representa. Dentro de

estas desventajas se encuentran, entre muchas otras: el aumento en el peso que reduce la flotabilidad, el movimiento y el crecimiento y además incrementa el riesgo de desunión por la corriente; la reducción considerable de la fotosíntesis en algas; el bloqueo en el intercambio de gases y la disminución de los nutrientes disueltos que llegan finalmente al hospedero. En estos ambientes también se encuentran organismos “limpios” como la macroalga *Delissea pulchra*, que controla el *biofouling* en su superficie por medio de la producción de una furanona halogenada que se asemeja a las AHLs usadas como moléculas señal por las bacterias Gram negativas, de tal modo que esta furanona se puede enlazar al sitio de unión de la proteína LuxR y así inhibir el QS. Otro ejemplo es el alga verde *Ulva lactuca* la cual depende de la bacteria epifítica *Pseudoalteromonas tunicata* para bloquear la formación de biopelículas por medio de la síntesis de sustancias pigmentadas que inhiben el control transcripcional dependiente de AHLs de una forma similar a la de las furanonas. Varias plantas terrestres producen moléculas parecidas a las moléculas señal del QS, las cuales pueden competir por el sitio de unión en la proteína tipo LuxR, el factor de transcripción de los circuitos de QS en bacterias Gram negativas (Li *et al.* 2007; Geske *et al.* 2008; Rasmussen & Givskov 2006a)

Un método común para detectar compuestos que inhiban QS, es utilizando organismos biosensores, estos organismos expresan un fenotipo visible bajo el control de QS, de esta forma, cuando se encuentra una sustancia que inhiba este fenómeno en el mismo medio en el que ellos crecen, estos no expresan el fenotipo que es controlado por QS. También hay cepas de bacterias biosensoras transformadas con un gen reportero bajo el control de un promotor del tipo *luxR*, cuando un complejo del tipo AHL-LuxR se une al promotor, este genera una sustancia que puede ser detectada por absorbancia (β -galactosidasa), fluorescencia (proteína verde fluorescente), o luminiscencia (luciferasa). Estas cepas no producen AHLs sintetasas funcionales, por lo que se debe adicionar un ligando AHL para que se active el sistema de QS (Li *et al.* 2007; Gobbetti *et al.* 2007).

Uno de los biosensores naturales más utilizados es la bacteria Gram negativa *Chromobacterium violaceum*, la cual tiene un circuito de QS del tipo LuxIR. La sintetasa Cvil de esta bacteria sintetiza la molécula señal N-hexanoil-L-homoserina lactona, la cual es detectada por el factor de transcripción CviR. Este circuito de QS regula la expresión de exoenzimas, antibióticos, cianuro y de la violaceína ((3Z)-3-[5-(5-hydroxy-1H-indol-3-

il)-2-oxo-1H-pirrol-3-ylideno]-1H-indol-2-ona), este último es un pigmento violeta (De-Kievit & Iglewski 2000; Antônio & Pasa 2004). Cuando la bacteria se encuentra en presencia de una sustancia inhibidora del QS, crece sin expresar este pigmento, por lo que sus colonias son blancas y no de color violeta, haciendo posible la detección de este tipo de sustancias por medio de la detección de halos de inhibición de la producción de violaceína (McLean *et al.* 2004).

1.5 Estrategias de inhibición de *Quorum Sensing*

Para inhibir el QS en bacterias Gram negativas hay básicamente tres blancos diferentes, estos son: la sintetasa responsable de la síntesis de la molécula señal, la molécula señal y el receptor de la señal.

El primer blanco en las Gram negativas es la sintetasa LuxI. Debido a que las moléculas señal AHLs son sintetizados por LuxI a partir de acil-ACP y SAM, análogos de estas moléculas deberían ser inhibidores eficaces de la sintetasa LuxI, de hecho moléculas análogas a estos compuestos han mostrado ser inhibidores de la sintetasa de *P. aeruginosa* RhII. Estos compuestos incluyen Holo-ACP, L/D-S-adenosilhomocisteína, sinefungin y butiril-SAM. El más efectivo es L-S-adenosilhomocisteína, el cual disminuye la actividad de RhII en un 97% en experimentos *in vitro*. Sin embargo, debido a que SAM y acil-ACP también son usados en el catabolismo central de aminoácidos y de ácidos grasos, no se sabe cómo afectan estos análogos a otras funciones celulares, pues no han sido probados en bacterias *in vivo* (Rasmussen & Givskov 2006a; Rasmussen & Givskov 2006b).

El segundo blanco en las bacterias Gram negativas es la molécula señal AHL. Una forma de inactivarla es aumentando el pH por encima de 7, esto causa lactonólisis de la AHL, este es uno de los mecanismos de defensa utilizado por plantas que son infectadas con el fitopatógeno *Erwinia carotovora*. Hay varios factores que influyen la apertura del anillo, por ejemplo un aumento en la temperatura la acelera, pero su efecto es contrarrestado por la longitud de la cadena lateral de la AHL, que disminuye la velocidad de lactonólisis.

La lactonólisis de AHLs también puede ser llevada a cabo por enzimas, miembros del género *Bacillus*, como *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. thuringiensis*, producen la enzima

AiiA, que es específica para la degradación de AHLs. Esta enzima actúa catalizando la reacción de apertura del anillo de las AHLs. Se ha visto que en 2 horas, hasta 20mM de N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL) puede ser completamente inactivada en un caldo de cultivo en el que la enzima es producida. Una desventaja del uso de esta enzima es que el pH del medio no puede ser ácido, porque la reacción de lactonólisis es reversible a este pH (Rasmussen & Givskov 2006b; Barczak & Hung 2009; Geske *et al.* 2008; Boyen *et al.* 2009; Suga & Smith 2003).

Las AHLs también pueden reaccionar con compuestos halogenados, algunas algas marinas producen haloperoxidasas que pueden catalizar la oxidación de bromuro y/o cloruro con peróxido de hidrógeno para producir compuestos bactericidas, como ácido hipobromoso (HOBr) o hipocloroso (HOCl). Estos compuestos son muy tóxicos para una amplia variedad de microorganismos, y como tal son usados para controlar el biofouling en sistemas de agua potable e industrial. Específicamente, AHLs llevando el grupo 3-oxo son rápidamente inactivados por exposición a HOCl y HOBr, mientras que las AHLs que no poseen este grupo retienen su actividad. Un ejemplo es el alga café *Laminaria digitata*, la cual produce bromoperoxidasa, que cataliza la reacción de bromuro a ácido hipobromoso en presencia de peróxido de hidrógeno, la incubación de 3-oxo-C6-HSL con *L. digitata* lleva la degradación de la AHL (Rasmussen *et al.* 2006; Boyen *et al.* 2009; Suga & Smith 2003).

Finalmente, el blanco más estudiado es el receptor de la señal, LuxR. Pues si se evita que las moléculas señal se unan a las proteínas parecidas a LuxR, este no puede actuar como un regulador transcripcional. Se han sintetizado muchas moléculas posibles inhibidoras de QS, las cuales son análogas a la molécula señal AHL. Hay principalmente tres formas de desarrollar estas moléculas: Introduciendo sustituciones en la cadena del grupo acilo las cuales mantengan al mismo tiempo el anillo lactona, introduciendo sustituciones y alteraciones en el anillo lactona las cuales mantengan al mismo tiempo la cadena del grupo acilo, y modificando tanto la cadena del grupo acilo como el anillo lactona. Sobre esto se sabe que la longitud de la cadena del acilo es importante para la actividad de moléculas que imiten AHLs, los compuestos que tienen cadenas con longitudes cercanas a las de las AHLs naturales aumentan su actividad inhibitoria. También se ha observado que análogos a AHLs, que llevan un sustituyente alquilo cíclico en el átomo de carbono más externo de la cadena lateral, actúan como agonistas

mientras que al reemplazar el átomo C-3 por azufre en la cadena lateral acilo, este análogo es capaz de bloquear la expresión en reporteros de QS controlados por LuxR y LasR (Persson *et al.* 2005).

Otros compuestos que inhiben QS pueden ser obtenidos localizando sustituyentes arilo al final de la cadena lateral, estos han mostrado ser efectivos en sistemas de QS controlados por 3-oxo-C6 HLS / LuxR. Si el tamaño de los sustituyentes es mayor al del grupo fenilo, el efecto antagonista se pierde. Ya que la diferencia de tamaño de los grupos sustituyentes alquilo cíclicos y arilo es mínima, se cree que los compuestos arilo pueden interactuar con residuos aromáticos de aminoácidos en la proteína LuxR, inhibiendo su activación normal. Además, se observó que el compuesto que tiene la cadena lateral de 3-oxo-C6 HLS unida a un anillo ciclohexano es un activador más fuerte mientras que el compuesto es un inhibidor si la cadena lateral está unida a un fenilo (Reverchon *et al.* 2002). Estos resultados muestran que la naturaleza del anillo sustituyente en la cadena lateral es importante para que la función de la AHL análoga sea de agonista o de antagonista. También hay que tener en cuenta la estereoquímica del anillo lactona, pues el L-estereoisomero del anillo es necesario para la actividad, hay pocas excepciones como por ejemplo la AHL 3-oxo-C12-HSL, molécula señal del receptor LasR, que es un D-estereoisomero. Por lo anterior es importante tener en cuenta que no siempre el L-estereoisomero es el más activo cuando se estudian mezclas racémicas de lactonas. Además se ha visto que modificaciones directas al anillo lactona son toleradas, pero no en todos los sistemas, estas modificaciones suelen resultar en compuestos que son menos activos. Por último, la incorporación de anillos aromáticos en las AHLs, ya sea como reemplazo del anillo lactona o como sustituyente en la cadena del acilo, suele resultar en análogos con actividad inhibitoria (Rasmussen *et al.* 2006b).

Se conocen pocos reportes sobre sustancias análogas al AI-2 S-THMF-borato, Ni y colaboradores (2008) probaron la actividad inhibidora de QS de varios ácidos borónicos, ya que estructuralmente estos compuestos son muy parecidos a AI-2 S-THMF-borato. En este estudio encontraron que 50 de estos ácidos eran capaces de inhibir *Quorum Sensing* en *V. harveyi* mediado por AI-2, varios de los ácidos efectivos eran ácidos fenilborónicos (Ni *et al.* 2008).

En la tabla 1-2 se muestran algunos ejemplos de moléculas con actividad inhibidora de QS, provenientes de bacterias, plantas, algas, hongos y mamíferos, junto con su forma de acción, todas las moléculas mostradas en esta tabla existen de forma natural.

Tabla 1-2: Moléculas encontradas en la naturaleza, con acción inhibidora de QS. (Dobretsov *et al.* 2009).

Inhibidor de QS	Fuente del compuesto		Modo de acción
	Grupo	Especie	
Enzimas degradadoras de AHLs			
AHL-lactonasa	Bacteria	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Degradación de las moléculas señal AHLs
		<i>Bacillus cereus</i>	
		<i>Bacillus mycoides</i>	
		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
AHL-acilasa	Bacteria	<i>Streptomyces</i> sp.	Degradación de las moléculas señal AHLs
		<i>Nocardioides</i> sp.	
		<i>Ralstonia</i> sp.	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Acilasa I	Mamíferos	Línea celular de los riñones de cerdo	Degradación de las moléculas señal AHLs
		<i>Anabaena</i> sp.	
Competidores con la molécula de QS			
Lactonas	Bacteria	<i>Streptomyces</i> spp.	Imitan las moléculas señal AHLs
3-oxo-C12-HSL, otras > C10-HSL	Bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Interfieren con AHLs de cadena corta
Ácido Cis-11-metil-2-dodecanoico	Bacteria	<i>Xanthomonas campestris</i>	Imitan la molécula señal ácido farnesoico de <i>C. albicans</i>
Dicetopiperazinas (DKP), Ciclo(Ala-1-Val), Ciclo(1-Pro-1-Tyr) y Ciclo(1-Phe-1-Pro)	Bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Compiten con las moléculas señal AHLs
Péptido inhibidor de RNAlII	Bacteria	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Compiten con las moléculas señal AHLs
Fenilamida	Bacteria	<i>Halobacillus salinus</i>	Antagonista de AHLs
Ácido tumonoico	Cyanobacteria	<i>Blennothrix cantharidosmum</i>	Compiten con las moléculas señal
Lumicromo	Microalga	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Imita las moléculas señal AHLs
Furanonas halogenadas	Macroalga	<i>Delisea pulchra</i>	Imita las moléculas señal AHLs
α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-glicerol (floridosida), betonicina, ácido isetiónico	Macroalga	<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	Compiten con las moléculas señal AHLs

Tabla 1-2: (Continuación)

Lactonas	Plantas Gymnospermas	<i>Hortonia</i> sp.	Imita las moléculas señal AHLs
Desconocido	Plantas Angiospermas	<i>Medicago truncatula</i>	Imita las moléculas señal AHLs
Dicetopiperazinas (DKP), Ciclo(Ala-1-Val), Ciclo(1-Pro-1-Tyr) y Ciclo(1-Phe-1-Pro)	Fungi	<i>Alternaria alternata</i>	Compite con las moléculas señal AHLs
Bromoalcaloides	Bryozoan	<i>Flustra foliacea</i>	Compite con las moléculas señal AHLs
Otros inhibidores de QS			
Ácido penicílico patulina	Fungi	<i>Penicillium</i>	Afecta los reguladores de QS
Compuestos ciclicos conteniendo azufre	Plantas Angiosperm	<i>Allium sativum</i>	Afecta genes regulados por RhIR
Compuestos halogenados oxidados	Macroalga	<i>Laminaria digitata</i>	Interfiere con genes de QS
Manoalide (monoacetato y secomanoalide)	Esponja	<i>Lucifariella variabilis</i>	Desconocido

1.6 Técnicas moleculares independientes de cultivo para la caracterización de comunidades bacterianas

Los métodos tradicionales empleados para determinar la composición de una comunidad bacteriana, requieren de técnicas dependientes de cultivo, las cuales consumen mucho tiempo y solamente funcionan para una minoría de las especies bacterianas presentes en una muestra, pues cualquier cambio ambiental durante el cultivo afectará la estructura de la comunidad bacteriana lo que resultará en una imagen errada del ecosistema estudiado, además la mayoría de bacterias no son cultivables. El término “the great plate count anomaly” fue utilizado en 1985 por y Staley y Konopka (Connon & Giovannoni 2002) para describir la diferencia en órdenes de magnitud entre el número de células provenientes de una muestra ambiental que pueden crecer y formar colonias en platos de agar y el número de células que se pueden contar por análisis microscópico. Por ejemplo, en los ecosistemas marinos se ha encontrado que solo entre el 0.01 y el 0.1% de las células bacterianas desarrollan colonias por técnicas tradicionales de cultivo (Connon & Giovannoni 2002). Las posibles razones para este fenómeno son: especies bacterianas que se encuentran en un estado de no crecimiento, tales como latencia, que previenen que las células se adapten a las condiciones encontradas en el medio usado; otra razón es que muchas de las especies que son abundantes en los ecosistemas marinos no se adaptan a medios de cultivo que contienen altas concentraciones de carbono orgánico y por último, especies que dependen de otras especies para crecer.

Hay muchos ejemplos de especies bacterianas que son muy comunes en la naturaleza pero que solo pueden ser cultivadas por técnicas especiales, como por ejemplo especies de *Acinetobacter* sp., y *Vibrio* sp. (Baxter & Sieburth 1984), *Thiobacillus ferrooxidans* (De Bruyn *et al.* 1990), *Synechococcus* sp., *Bacillus flavothermus* (Nold *et al.* 1996), *Serratia maninorubra*, *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp. y *Alteromonas haloplanktis* (Schut *et al.* 1993).

Por lo anterior, y aún más considerando el estudio de comunidades bacterianas complejas, se necesitan técnicas que permitan estudiar la actividad y distribución de los microorganismos directamente en el ambiente en el que estos se encuentran. Por consiguiente, con el fin de identificar y cuantificar los microorganismos presentes en ciertos ecosistemas, se han desarrollado técnicas moleculares las cuales son independientes de cultivo. Algunas de estas técnicas están basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo éstas proveen limitada información sobre el número y la distribución de los microorganismos estudiados. Estas limitaciones pueden ser superadas por las técnicas de hibridización fluorescente *in situ* (FISH) con sondas de oligonucleótidos cuyo blanco es el ARNr.

1.6.1 Hibridización fluorescente *in situ* (FISH) como técnica para caracterización de comunidades bacterianas

La hibridización fluorescente *in situ* FISH es un método independiente de cultivo que permite analizar la composición y dinámica de las comunidades microbianas estudiadas. Las primeras técnicas de hibridación *in situ* usadas fueron realizadas por Ritosa & Spiegelman en 1965 y por Gall & Pardue en 1969 usando sondas marcadas radioactivamente, en 1977 Rudkin & Stollar introdujeron el uso de sondas marcadas con fluorescencia (Ritossa & Spiegelman 1965; Gall & pardue 1969; Rudkin & Stollar 1977).

Para la caracterización filogenética se usa como blanco el ARNr (Amann *et al.* 1995), macromolécula que fue usada como cronómetro molecular por Woese en 1987 (Woese 1987). Uno de los primeros trabajos en los que se uso FISH como técnica para la identificación filogenética de microorganismos fue realizado por DeLong y colaboradores en 1989 (DeLong *et al.* 1989). El uso de FISH en este campo tiene varias ventajas, entre las que están que es una técnica rápida comparada con las técnicas de cultivo convencional, además permiten la detección de un mayor número de grupos bacterianos

que las técnicas de cultivo, ya que éstas últimas solo sirven para una minoría de las especies bacterianas presentes en una muestra, pues la gran mayoría no son cultivables. El uso de ARN ribosomal como moléculas blanco se debe a que éstas se encuentran en todos los organismos vivos, pues todas las células necesitan ribosomas para la traducción, estas moléculas son relativamente estables y se encuentran en un alto número de copias, una sola célula puede contener entre unos cientos a 100000 copias, ya que incluyen dominios de secuencias variables y altamente conservadas, lo que permite catalogarlas como secuencias únicas para un determinado grupo de microorganismos variando entre todos los phylum hasta especies individuales (Amann *et al.* 2001; Amann *et al.* 1995; Amann & Fuchs 2008).

En la figura 1-3 se muestra un esquema general del procedimiento usado en FISH.

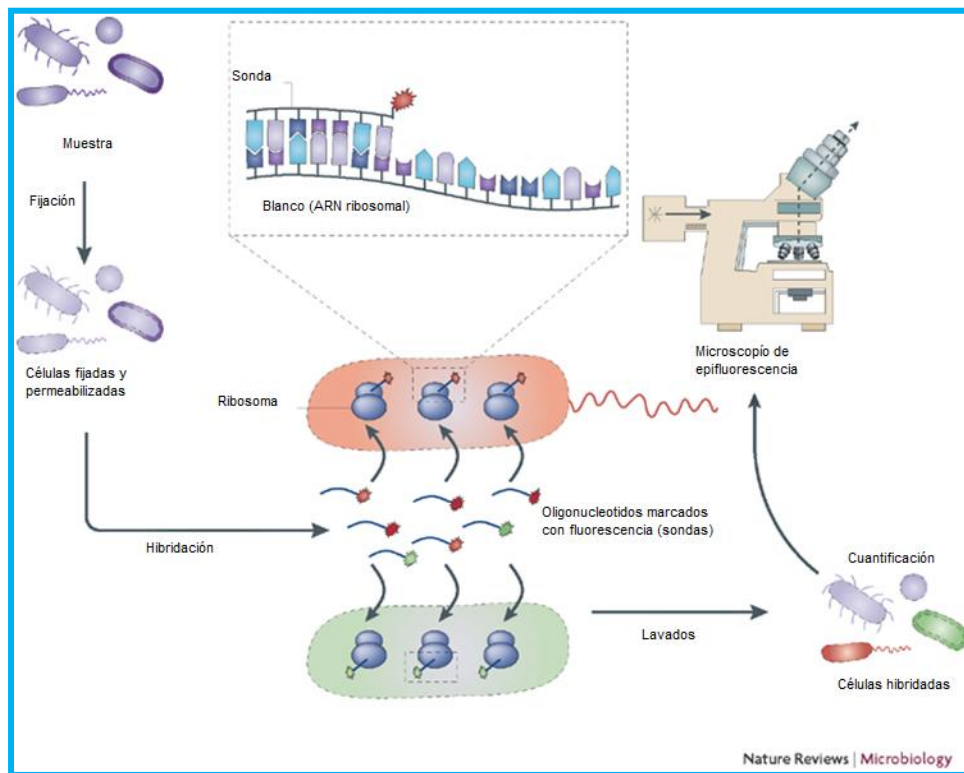


Figura 1-3: Esquema general del procedimiento usado en la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) para la identificación filogenética de microorganismos. (Amann *et al.* 2008).

Como se muestra en la figura 1-3 el protocolo general de FISH incluye los siguientes pasos principales (Roche Diagnostics 2002):

- Embalsamamiento y permeabilización de la muestra: hace la pared celular permeable a las sondas y ayuda a preservar las células de las proteínas y enzimas denaturalizantes previniendo la degradación del ARN o ADN. Entre las principales sustancias usadas para fijar las células de la muestra se encuentran el paraformaldehído, etanol, soluciones de ácido acético/formaldehído y metanol/formaldehído. También se usan tratamientos post-fijación para hacer la pared celular más permeable a las sondas, estos tratamientos incluyen el uso de calor, deshidratación con soluciones de diferentes concentraciones de etanol y el uso de enzimas como la lisozima y la proteinasa K, usadas principalmente en bacterias Gram positivas y levaduras para ayudar a degradar proteínas embebidas en la envoltura celular y proteínas ribosomales.
- Hibridación: en este paso el primer punto a tener en cuenta es la sonda que va a ser empleada, esta puede ser proveniente de ADN, cADN o ARN, en cada uno de los casos la preparación de la sonda es diferente, así las sondas de ADN se preparan por aislamiento de fragmentos, las de cADN por clonación, las de ARN por clonación en vectores de transcripción y las sondas de oligonucleótidos por síntesis química. Después de la preparación de la sonda se debe tener en cuenta la forma como ésta va a ser marcada, en este caso se usan sondas de oligonucleótidos cuya longitud es de 15 a 50 nucleótidos y cuya marcación se hace uniendo la molécula fluorescente al extremo 5' de la sonda. Para la hibridación también se usan pre tratamientos del material en el portaobjetos, estos incluyen tratamientos con RNasas cuando se hacen hibridaciones ADN-ADN, tratamientos con HCl, con detergentes para extraer los componentes lípidicos de la membrana y tratamientos con proteasas para aumentar la accesibilidad de la sonda a la secuencia blanco. Los principales parámetros que afectan la hibridación son la temperatura de fusión y renaturación, la cual depende de la temperatura, el pH y la concentración de cationes monovalentes, de estos últimos se ha visto que altas concentraciones incrementan la estabilidad del híbrido. La concentración de formamida también reduce la temperatura de fusión de ADN-ADN y de ADN-ARN y su relación es $0.72^{\circ}\text{C} / \% \text{ de formamida}$. Otros parámetros que afectan la hibridación son la longitud de la sonda, su concentración, la concentración de sulfato dextrano que aumenta la velocidad de

hibridación de la sonda y el mal apareamiento de bases que reduce la tasa de hibridación y la estabilidad térmica de los dúplex resultantes.

- Lavados para remover sondas no unidas: estos son denominados lavados de astringencia y se usan para remover los híbridos mal apareados. Para esto se recomienda usar una alta astringencia para hibridizar (mayor especificidad) y lavados con similar o mayor astringencia. Para estos lavados se emplean soluciones diluidas de sales, entre más alta la concentración de sales y mayor la temperatura de lavado, más astringente es éste.
- Detección de células marcadas por microscopía: la detección de las células marcadas es directa y se hace en un microscopio de epifluorescencia. En este punto es importante tener en cuenta la homogeneidad de la muestra, ya que de ella depende la cuantificación.

1.6.1.1 CARD-FISH (catalysed reported deposition fluorescence in situ hybridization)

El contenido de ribosomas en las células bacterianas es variable, por ejemplo el número promedio de ribosomas en una célula de *E. coli* es de 72000 en la fase exponencial de crecimiento, con un tiempo de generación de 24 minutos, en bacterias con tiempos de generación de 100 minutos el número de ribosomas es de 6800 y en bacterias pequeñas, que tienen un diámetro de 0.5 μm , el número de ribosomas puede ser de tan solo unos cuantos cientos debido a restricciones de espacio. Detectar estas células pequeñas, por ejemplo, con sondas fluorescentes de oligonucleótidos monomarcados es difícil. Su detección puede ser mejorada con sondas marcadas con pigmentos brillantes de carbocianina (Cy3), para mayor sensibilidad han sido usadas mezclas de cuatro oligonucleótidos monomarcados los cuales serán complementarios a cuatro zonas diferentes del ARNr 16S (Amann & Fuchs 2008).

Otra alternativa para mejorar la sensibilidad es usar sondas marcadas con peroxidasa de rábano junto con una deposición catalizada (catalysed reported deposition) de tiramidas marcadas fluorescentemente, esta técnica se conoce como CARD-FISH. En ésta, como se dijo anteriormente, se usan sondas marcadas con peroxidasa de rábano en la reacción de hibridación, la cual es seguida por un paso de amplificación de la señal que está basada en “*catalysed reported deposition*”, ésta consiste en adicionar moléculas de

tiramida marcadas fluorescentemente a la muestra que ha sido hibridizada con las sondas marcadas con peroxidasa de rábano, las moléculas de tiramida activarán la peroxidasa de rábano en las sondas, produciendo intermediarios altamente reactivos, los cuales son capaces de unirse a motivos de proteínas tales como tirosinas que se encuentran cerca al sitio de unión de la sonda dentro de la célula, de esta forma muchas moléculas fluorescentes estarán en la vecindad del sitio blanco de la sonda, lo cual llevará a una alta intensidad de la señal mejorando la sensibilidad, en la figura 1-4 se muestra el principio de esta técnica.

En esta técnica se debe tener especial cuidado con el paso de fijación de las células, ya que la penetración de las sondas marcadas con peroxidasa de rábano es más difícil, pues la peroxidasa tiene un mayor tamaño comparada con los fluorocromos empleados en FISH. Actualmente, los protocolos de fijación de las células para ser analizadas por CARD-FISH incluyen tratamientos enzimáticos con lisozima, proteinasa K y acromopeptidasa (Kubota *et al.* 2008). El tratamiento empleado depende de las células estudiadas, por ejemplo, si se tienen células con una capa ancha de peptidoglicano se usarán tratamientos con lisozima, si las células tienen una pared celular proteica se tratarán con peptidasas, si las células tienen ceras en la pared celular, éstas serán extraídas con solventes. Por lo anterior, esta técnica suele ser menos eficiente para detectar células en conglomerados que FISH con sondas fluorescentes monomarcadas, esto es debido a la baja difusión de la sonda marcada con peroxidasa de rábano o a la limitada penetración de ésta a través de sustancias poliméricas extracelulares (Amann & Fuchs 2008).

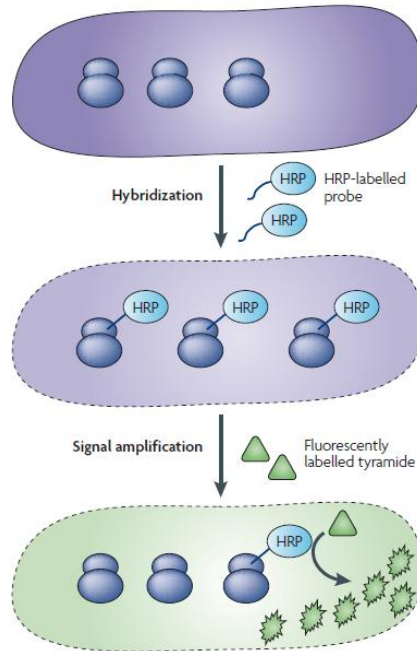


Figura 1-4: Principio de la técnica CARD-FISH. La hibridización involucra un solo oligonucleótido que está unido covalentemente a la peroxidasa de rábano. La amplificación de la señal está basada en la radicalización de numerosas moléculas de tiramida por una sola peroxidasa de rábano. Tomada de Amann (2008).

1.6.2 Pirosecuenciación como técnica para la caracterización de comunidades bacterianas.

La pirosecuenciación hace parte de las técnicas de nueva generación de secuenciación por síntesis y en los últimos años ha sido ampliamente utilizada para estudiar la composición de comunidades bacteriana de muestras ambientales, como por ejemplo en esponjas del mar rojo (Lee *et al.* 2011). Una de las aplicaciones más comunes de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento es la metagenómica, en la que estas técnicas son empleadas en el estudio directo de comunidades de microorganismos y sus ambientes naturales. El uso de estas técnicas evita el aislamiento y el cultivo de especies individuales en el laboratorio (Jones 2009). A comienzos del 2006, surgieron varios trabajos en los que se estudia la diversidad microbiana a través del gen ribosomal 16S (Sogin *et al.* 2006) y la genética ambiental de microorganismos (Edwards *et al.* 2006), también se encuentran trabajos sobre la ciencia de los estuarios y el estudio de los ambientes costeros.

Esta técnica se fundamenta en la adición secuencial de nucleótidos a un oligonucleotido de secuenciación que está hibridizado a una secuencia de ADN de cadena sencilla, la hebra molde. La secuencia de la cadena molde puede ser deducida del orden en el que los nucleótidos son incorporados a la hebra creciente de ADN (Ahmadian *et al.* 2006). En la pirosecuenciación cada incorporación de un nucleótido por la ADN polimerasa lleva a la liberación de pirofosfato, el cual inicia una cadena de reacciones que finalizan con la producción de luz, la cantidad de luz producida es proporcional al número de nucleótidos incorporados (Mardis 2008).

La pirosecuenciación empieza con una librería de fragmentos de ADN (figura 1-5a), a los cuales, en un extremo se les ha adicionado un fragmento de ADN del tamaño de un cebador, fragmento que es conocido como adaptador y cuya secuencia es igual para todas las muestras de fragmentos de ADN que son analizadas por esta técnica. Al otro extremo de los fragmentos de ADN de la librería se adiciona otro fragmento corto de ADN, del tamaño de un cebador, el cual se conoce como una secuencia de código de barras porque es específica para cada una de las muestras analizadas, de esta forma se distinguen unas de otras para el análisis en un mismo bache de pirosecuenciación (1-5b). Estos fragmentos de la librería de ADN modificados (adaptador-fragmento de ADN de la librería-código de barras) son mezclados con esferas de agarosa, cuya superficie tiene adheridos oligonucleótidos complementarios a las secuencias del adaptador unido a los fragmentos de ADN de la librería, de esta forma los fragmentos se puedan unir a las esferas de agarosa. Cada uno de estos complejos fragmento-esfera es aislado dentro de micelas individuales de agua y aceite, las cuales contienen los reactivos necesarios para que se lleve a cabo una reacción en cadena de la polimerasa, de esta forma un ciclo de PCR de las micelas (PCR en emulsión) resulta en aproximadamente un millón de copias de cada uno de los fragmentos de ADN en la superficie de cada esfera.

A las esferas de agarosa se puede hibridizar un único fragmento de la librería de ADN, de lo contrario ésta no será aislada en la micela de agua y aceite (figura 1-5c). (Mardis 2008). Las esferas de agarosa con los fragmentos amplificados son dispuestas en una placa de "picotitulación" de tal forma que una sola esfera estará en cada uno de los pozos, estos pozos dan una ubicación fija a cada una de las esferas, en la cual cada reacción de secuenciación puede ser monitoreada. Después se adicionan esferas que contienen cuatro enzimas el fragmento Klenow de la DNA polimerasa, ATP sulfurilasa,

Luciferasa y apirasa; y dos sustratos de las enzimas: adenosina 5' fosfosulfato (APS) y d-luciferina (Ahmadian *et al.* 2006) (figura 1-5d). La placa actúa como una celda de flujo dentro de la cual cada una de las soluciones de los nucleótidos puros es adicionada paso a paso, con un paso de proyección de imagen después de la incorporación de cada uno de los diferentes nucleótidos (figura 1-5e) (Mardis 2008).

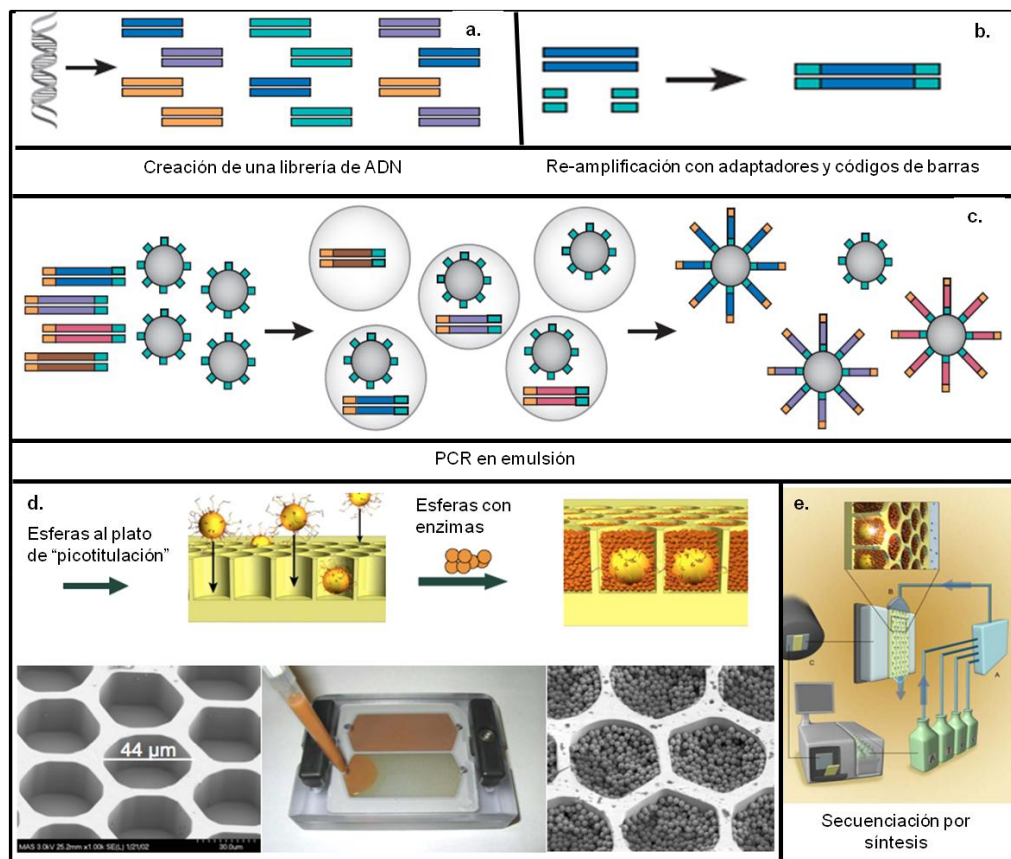


Figura 1-5: Procedimiento general de la técnica de pirosecuenciación. (Margulies *et al.* 2005; Shendure & Ji 2008).

Las reacciones dentro de la placa comienzan con la adición del primer nucleótido trifosfato (dNTP), la ADN-polimerasa cataliza la incorporación de éste en la cadena de ADN, si es complementario a la hebra plantilla, ésta es seguida por la liberación de pirofosfato en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado (figura 1-6a). La ATP-sulfurilasa convierte el pirofosfato en ATP en presencia de APS (figura 1-6b), el ATP producido media la transformación de la luciferina en oxiluciferina, reacción catalizada por la luciferasa (figura 1-6c). La oxiluciferasa genera luz visibles en

cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP, esta luz es detectada por un dispositivo de carga acoplada, pues la placa de pirosecuenciación es situada frente a una cámara que graba la luz emitida en cada esfera y se ve como un pico en un picograma, en el que la altura de cada pico es proporcional al número de dNTPs incorporados. Finalmente, la apirasa continuamente degrada los nucleótidos no incorporados y el ATP, cuando la degradación es completa se adiciona otro nucleótido (figura 1-6d) (Ahmadian *et al.* 2006).

Los primeros cuatro nucleótidos en el adaptador añadido durante la preparación de las secuencias, corresponden a la secuencia TCGA. Esto permite al equipo calibrar la luz emitida por la incorporación de un solo nucleótido, sin embargo el equipo no es capaz de interpretar correctamente secuencias con más de 6 del mismo nucleótido (corridos de homopolímeros), por lo que estos pedazos de secuencia están expuestos a inserciones y deleciones. Por el contrario, los errores de sustitución son muy raros debido a que cada paso de incorporación es nucleótido específico (Mardis 2008)

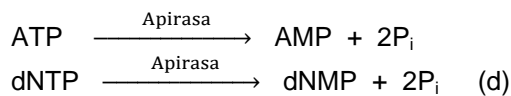
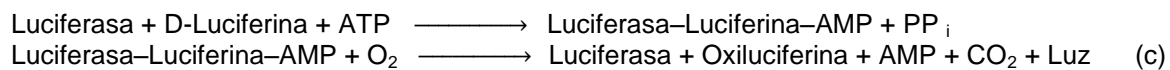
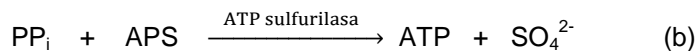
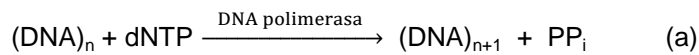


Figura 1-6: Reacciones involucradas en pirosecuenciación. (a). La primera reacción que se lleva a cabo es la incorporación de dNTPs en la síntesis de la cadena complementaria a la hebra de ADN molde y resulta en la liberación de pirofosfato (PPi), el cual reacciona con la APS en presencia de la ATP sulfurilasa (b) para producir ATP, el cual reaccionará con la luciferasa, la D-luciferina y oxígeno para producir oxiluciferina y luz, esta última es detectada y graficada como un pico en un pirograma, cuya altura es proporcional a la cantidad de luz producida, que a su vez es proporcional a la cantidad de

ATP sintetizado en el paso anterior y por consiguiente a la cantidad de PPi liberado durante la incorporación de un nucleótido en la síntesis de ADN.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

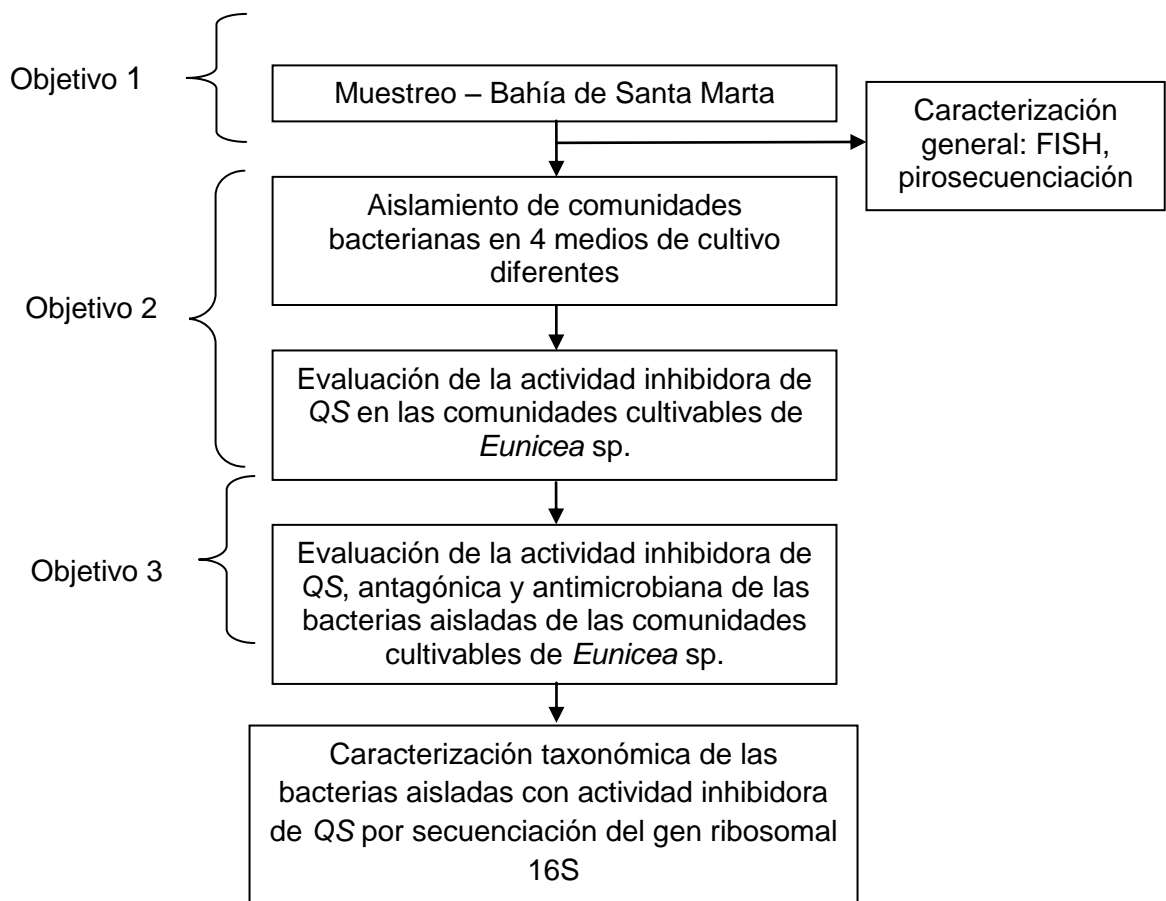
Caracterizar mediante técnicas moleculares *in situ* las comunidades bacterianas de los octocorales *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae* e iniciar la búsqueda de relaciones ecológicas entre ellos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar mediante Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH) y secuenciación del gen ribosomal 16S RNA la estructura y distribución de la población bacteriana de los octocorales *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae*.
- Evaluar la actividad inhibidora de *Quorum Sensing* de las comunidades bacterianas aisladas del octocoral *Eunicea* sp.
- Evaluar el antagonismo entre bacterias aisladas del octocoral *Eunicea* sp.

3. Metodología

Esquema general



3.1 Toma, preparación de las muestras y condiciones de cultivo

3.1.1 Toma de muestras del octocoral *Eunicea* sp.

Las muestras del octocoral se recolectaron a 15 metros de profundidad en Isla Aguja (11°18'57"N 74°11'41"W) al noreste de la Bahía de Santa Marta – Colombia durante octubre de 2009. Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio de la Universidad Jorge Tadeo Lozano sede Santa Marta, donde fueron lavadas con *buffer* PBS estéril.

3.1.1.1 Aislamiento de comunidades cultivables asociadas con el octocoral *Eunicea* sp., y purificación de cepas para pruebas de inhibición de QS.

Para aislar las comunidades cultivables asociadas al coral, se incubó un fragmento de aproximadamente 1.5 cm de longitud en los medios de cultivo: Luria Bertani (LB), medio marino (MM), tripticasa de soya (ST) e infusión cerebro – corazón (BHI) a 26°C, con agitación por 24 horas. Paralelamente, se tomaron fragmentos de 1.5 cm y se maceraron en un mortero con *buffer* PBS pH 7.0 estéril, del macerado se hicieron diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} que se sembraron en cajas de Petri con los mismos medios de cultivo empleados para aislar las comunidades cultivables, de estas diluciones se purificaron las colonias presentes para obtener la colección de cepas cultivables pertenecientes al octocoral, esto se hizo utilizando siembra por agotamiento.

3.1.1.2 Preparación de las muestras del coral *Eunicea* sp., para ensayos de hibridización fluorescente *in situ* (FISH)

Del macerado obtenido en el numeral 3.1.1.1, se tomaron 10 mL los cuales se embalsamaron con 10 mL de una mezcla de formaldehído 37% (p/p): ácido acético glacial (1:1), se dejaron en esta solución por 15 minutos, transcurrido este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos, la fase sólida (macerado) se lavó tres veces con 10 mL de PBS cada vez y finalmente se conservó en una solución de PBS : etanol absoluto 1:1 a -20°C.

3.1.1.3 Preparación de la muestras del coral *Eunicea* sp., para ensayos de pirosecuenciación

Del macerado obtenido en el numeral 3.1.1.1, se tomaron 10 mL y se les adicionó fenol : cloroformo : isoamílico 25:24:1 para extraer el ADN total de la muestra. Después de seguir un protocolo general de extracción del ADN de las bacterias asociadas al octocoral, el ADN obtenido se purificó empleando el kit de purificación de ácidos nucleicos PureLink™ de Invitrogen.

3.1.2 Preparación de las muestras del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* para ensayos de FISH

Las muestras del octocoral se recolectaron en Providencia - Colombia. Se tomaron fragmentos de 5 cm y se lavaron con *buffer* PBS pH 7.0 estéril, éstos fragmentos se sumergieron en 10 mL de una mezcla de formaldehído 37% (p/p): ácido acético glacial (1:1) para su embalsamamiento. Las muestras se trataron de dos formas diferentes para hacer las hibridaciones y los posteriores análisis por FISH. En un caso se utilizó el raspado de las ramas del octocoral y se resuspendió en PBS, también se utilizó la suspensión del tubo en el que se encontraba la muestra embalsamada y por último se utilizó la suspensión después de someter las ramas a un baño con ultrasonido por 15 minutos.

3.2 Caracterización molecular de la comunidad bacteriana asociada con los octocorales *Eunicea* sp., y *P. elisabethae*

3.2.1 Hibridización fluorescente *In situ* (FISH)

3.2.1.1 Embalsamamiento de las células

Para la caracterización *in situ* de la comunidad bacteriana asociada con los octocorales una de las técnicas utilizadas fue la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). El embalsamamiento de las células bacterianas para su posterior análisis por FISH fue adaptada, para lo que se probaron 4 métodos diferentes (Zwirgmaier *et al.* 2003). Se usaron cultivos en medio líquido Luria Bertani (LB) de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, incubados a 37°C hasta que alcanzaron una OD_{600nm}= 0.400, las células fueron

centrifugadas por 10 min., a 5000 rpm y el *pellet* fue resuspendido en 1 a 2 mL de PBS, a éste se le adicionaron 3 vol. de paraformaldehído 4% v/v, 1 vol. de etanol absoluto, 1 vol. de una mezcla de formaldehído 37% (p/p) : ácido acético glacial (1:1), 1 vol. de metanol : formaldehído 37% (p/p) (9:1), por separado para probar cada una de estas soluciones como embalsamadores. Las mezclas se incubaron por 12-16 h a 4°C para las dos primeras soluciones y a temperatura ambiente por 15 minutos para las dos últimas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron nuevamente las muestras y el *pellet* obtenido se lavó con PBS, se centrifugó nuevamente y finalmente se re-suspendió en una mezcla de PBS: etanol absoluto 1:1 y se almacenaron las células a -20°C. Posteriormente se tomaron 10 ul de cada una de las muestras, se depositaron en láminas de vidrio, se fijaron con calor y se deshidrataron con soluciones de etanol al 50%, 80% y 100% v/v por 2 min., cada vez. Se dejaron secar y se tiñeron con bromuro de etidio para evaluar al microscopio óptico de fluorescencia Carl Zeiss® Axiophot los métodos de fijación utilizados. Ya que el bromuro de etidio absorbe a una longitud de onda de 510 nm y emite a 600 nm, su señal fue vista con el filtro para emisión roja que tiene un rango de 592 a 675 nm, las fotos se tomaron con un aumento de 100X y un tiempo de exposición de 1/8". Para estas pruebas se llevaron a cabo controles negativos en los que fue posible observar que las células no eran autofluorescentes a las longitudes de onda trabajadas. Cada una de las pruebas fue realizada por triplicado (Zwirgmaier *et al.* 2003).

3.2.1.2 Determinación de autofluorescencia de las muestras

Antes de iniciar las hibridaciones con las muestras, se determinó si éstas presentaban autofluorescencia. Para esto se tomaron 10 ul de cada una de las muestras en cada uno de los tratamientos anteriormente nombrados, se gotearon en una lámina de vidrio y se dejaron secar, sin ninguna sonda o compuesto fluorescente, posteriormente se observaron al microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss® Axiophot con un aumento de 100X y empleando el juego de filtros F2 (azul: rango de emisión en una longitud de onda de 377 a 464 nm, verde: rango de emisión en una longitud de onda de 470 a 560 nm y rojo: rango de emisión en una longitud de onda de 592 a 675 nm). Para obtener las imágenes se usaron diferentes tiempos de exposición entre 4" a 1/30" para determinar en cuál de éstos se observaba la menor señal de fondo de las muestras estudiadas. Esta determinación se hizo tanto para las muestras de *Pseudopterogorgia elisabethae*, como para las de *Eunicea* sp.

3.2.1.3 Análisis *in situ* FISH en láminas

Se gotearon 8 μ l de la muestra sobre una lamina de vidrio limpia, se dejó secar la muestra y se fijó con calor a 46°C por 20 minutos, la muestra seca fue cubierta con 16 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0.1% precalentada a 46°C, la agarosa se dejó secar y se fijó con calor por 20 minutos a 46°C. En las primeras hibridaciones no se realizó este paso, fue necesario implementarlo posteriormente ya que fue evidente la pérdida considerable de biomasa, sobre todo cuando se hicieron las deshidrataciones y lavados que se describirán posteriormente. Es importante mencionar que esta pérdida no se reducía considerablemente cuando se realizó FISH en tubos (Coleman *et al.* 2007). La muestra fue deshidratada en soluciones de etanol de 50%, 80% y 100% v/v secuencialmente, 2 minutos por cada solución. Una vez secas, se adicionaron 8.00 μ l de *buffer* de hibridación (360 μ L de NaCl 5M, 40.0 μ L de Tris-Cl pH 8.0 1M, 700 μ l de formamida, 4.00 μ L de SDS 10% (p/v) y agua hasta 2.0 mL), y 1.00 μ l de cada una de las sondas usadas (las sondas marcadas con Alexa488 y 532 se usaron a 75 ng/ μ L, mientras que las sondas marcadas con Cascade Blue y Alexa594 se usaron a 30 ng/ μ l) (Tabla 3-1), por último se taparon con láminas cubreobjetos. Las muestras con el *buffer* de hibridación y las sondas fueron incubadas a 46°C por 16 horas en una cámara de humedad constante. Posteriormente la lámina fue lavada con *buffer* de lavado (1mL de Tris-Cl pH 8.0 1M, 700 μ l de NaCl 5M, 500 μ l de EDTA 0.5M, 50 μ l de SDS 10% (p/v) y agua hasta 50 mL) precalentado a 48°C, sobre las muestras se gotearon 50 μ l de *buffer* de lavado y se incubaron por 15 minutos a 48°C en una cámara de humedad constante, este procedimiento se llevó a cabo dos veces (este paso, hace parte de una modificación hecha al procedimiento estándar pues, como ya se explicó, había una pérdida importante de biomasa durante los lavados, los cuales se hacían sumergiendo la lámina en un tubo con 50 mL del *buffer* de lavado). Después de lo anterior, las láminas se lavaron con *buffer* de lavado precalentado a 48°C y con agua destilada fría. Finalmente se dejaron secar y el montaje para el microscopio se preparó utilizando medio Sigma® a base de glicerol y *buffer* PBS pH 7.2. Las muestras se observaron en el microscopio óptico de fluorescencia Carl Zeiss® Axiophot con cámara acoplada. Las imágenes fueron obtenidas usando un aumento de 100X y un tiempo de exposición de ¼" para las muestras del octocoral *Eunicea* sp., y de ½" para las muestras del octocoral *P. elisabethae*. Se utilizaron los filtros mencionados en el numeral 3.2.1.2., para cada uno de los ensayos se tomaron entre 15 y 25 fotos por filtro. Las imágenes fueron analizadas

usando el software ImageJ (Zwirgmaier *et al.* 2003; Roche Diagnostics 2002; N. Lee 2010; Abràmoff *et al.* 2004).

3.2.1.4 Análisis *in situ* FISH en tubos

Se adicionaron 25 ul de la muestra embalsamada en un tubo de 500 ul, la muestra se secó utilizando un *speedVac* y se deshidrató secuencialmente en soluciones de etanol al 50%, 80% y 100% v/v 2 minutos cada vez. La muestra se secó nuevamente y se adicionaron 16.5 ul de *buffer* de hibridización (360 ul de NaCl 5M, 40 ul de Tris-Cl pH 8.0 1M, 4 ul de SDS 10% (p/v) a 2 mL) y 1.65 ul de cada una de las sondas (las sondas marcadas con Alexa488 y 532 se usaron a 75 ng/uL, mientras que las sondas marcadas con Cascade Blue y Alexa594 se usaron a 30 ng/ul) (Tabla 3-1), la mezcla anterior se incubó toda la noche a 46 °C, transcurrido este tiempo se gotearon 15 ul en una lámina de vidrio limpia que se dejó secar a 46°C protegida de la luz, luego se lavó y se sumergió la lámina en *buffer* de lavado precalentado a 48°C (1 mL de Tris-Cl pH 8.0 1M, 9 mL de NaCl 5M, 50 ul de SDS 10% (p/v) a 50 mL de agua), se incubó por 15 min., a 48 °C, luego se removió el *buffer* de lavado con agua destilada fría y se secó la lámina. Finalmente se adicionó una gota de *buffer* PBS pH 7.2 estéril, se cubrió con una lámina cubreobjetos y se observó en el microscopio óptico de fluorescencia Carl Zeiss® Axiophot. Las imágenes fueron obtenidas usando un aumento de 100X, empleando los filtros mencionados en el numeral 3.2.1.2. Las imágenes se obtuvieron empleando el programa Lucia® 5.3. (Zwirgmaier *et al.* 2003; Roche Diagnostics 2002; N. Lee 2010).

3.2.1.5 Análisis *in situ* por CARD-FISH

Esta técnica consiste en cuatro pasos que son: síntesis de la tiramida, permeabilización, hibridización y amplificación. Para el primer paso se mezclaron 100ul de Alexa® 488 succinimidil éster con 25.2 ul de solución *stock* de tiramina (100 mg de tiramina-HCl y 1 mL de N, N-dimetilformamida – trietilamina 100:1), esta mezcla se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 12 h, luego se diluyeron 874.8 ul de la anterior mezcla en 1ml con etanol absoluto y se almacenó a -20°C. Para la permeabilización se adicionó la mezcla enzimática (100mg de lisozima, 1ml de 1M Tris-HCl pH 8.0, 1ml 0.5M EDTA y 8ml de agua) a una caja de Petri, se sumergió la lámina (con las muestras goteadas previamente) en la caja y se incubó por 1h a 37°C, transcurrido este tiempo se lavó la

lámina con agua tipo I dos veces, se sumergió la lámina por un corto periodo de tiempo en etanol al 95% p/p y se secó. Para la hibridización, se adicionaron 20 ul de *buffer* de hibridización (1g de sulfato de dextrano, 1.8mL de NaCl 5M, 200ul de Tris-HCl 1M pH 8.0, 5ul de TritonX100 100%, 1mL de Blocking R 10%, 5.5mL de formamida y 1.5 mL de agua) y 1ul de la sonda marcada con peroxidasa de rábano en la lámina, ésta se incubó a 35°C por 15h en la oscuridad, después se sumergió la lámina en *buffer* de lavado (30ul de NaCl 5M, 1mL de Tris-HCl 1M, 500ul de EDTA 0.5M, agua hasta 50mL y 50ul de SDS 10%), el cual había sido precalentado a 37°C, se incubó a 37°C por 15 min, se lavó y secó. Para la amplificación se incubó la lámina en PBS-T (25ul de TritonX100 100% y 49.750mL de PBS) a temperatura ambiente por 10-15 min, se adicionaron 15ul de una mezcla de substrato (493ul de *buffer* de amplificación (2g de sulfato de dextrano, 8mL de NaCl 5M, 200ul de Blocking R y 11.8mL de PBS), 5ul de una mezcla de 200ul de *buffer* de amplificación y 1ul de H₂O₂ al 30% y 2.5ul de Alexa® 555), luego se lavó la lámina en 50mL de PBS-T a temperatura ambiente en la oscuridad, se lavó con agua tipo I, después con etanol absoluto, se secó y se preparó el montaje para el microscopio con DAPI (Lee 2010).

La primera hibridización hecha de la muestra del octocoral *Eunicea* sp., y la hibridización hecha usando la técnica de CARD-FISH fueron realizadas en el Laboratorio de Sistemas Ecológicos Microbianos del Departamento de Microbiología de la Universidad Técnica de Múnich en el marco del curso “In Situ Detection of Microbial Structure and Function in the Environment” el cuál se llevó a cabo del 25 al 28 de enero del año 2010.

3.2.1.6 Concentración de la muestra del octocoral *Eunicea* sp.

Se adicionaron 5mL de una solución de Na₄P₂O₇ a 2.5mL de muestra fijada, esta mezcla se incubó a 4°C con agitación por 2h, luego se adicionaron 2.5mL de dextran, 3.75mL de PEG y 17.25mL de agua, manteniendo la mezcla a 4°C se dejó en reposo hasta que todas las partículas decantaran, después se removió la fase inferior, se centrifugó a 14000 rpm por 2 min., y se removió el sobrenadante (Lee 2010).

Tabla 3-1: Sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos usadas para FISH

Sonda	Secuencia 5' – 3'	Sitio blanco 16S, 23S ARNr	Especificidad	Marcaje	Abs. (nm)	Emi. (nm)	Ref.
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338 – 355	Eubacterias	Alexa 488	495	519	(Amman <i>et al.</i> 1995)
ALF443	CGGAGTTAGCCGGGGC	443 – 456	α -proteobacteria	Cascade Blue	399	423	(Hernández-Zárate & Olmos-Soto 2006)
EUBI	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338 – 355	Eubacterias	Cy5	643	667	(Lee 2010)
EUBII	GCAGCCACCCGTAGGTGT	338 – 355	Eubacterias	FITC	495	520	(Lee 2010)
EUBIII	GCTGCCACCCGTAGGTGT	338 – 355	Eubacterias	Cy3	552	570	(Lee 2010)
GAM42a	GCCTCCCACATCGTTT	1027-1043	γ -proteobacterias	Alexa 594	590	617	(Lee 2010)
BET42a	GCCTCCCACATCGTTT	1027-1043	β -proteobacteria	Alexa 532	532	554	(Lee 2010)

Las sondas fueron marcadas por el extremo 5' con los fluorocromos mostrados en la tabla.

3.2.2 Análisis *in situ* por pirosecuenciación del gen ribosomal 16S RNA

Debido a la autofluorescencia evidenciada en las muestras del octocoral *Eunicea* sp., la caracterización de la comunidad bacteriana asociada a éste se hizo por medio de la técnica de pirosecuenciación. Para esto, se extrajo ADN de la muestra de *Eunicea* sp., macerada, éste se purificó recuperando la banda de un gel de agarosa de bajo punto de fusión empleando el kit de purificación PureLink Quick Gel extraction de Invitrogen®, del ADN purificado se amplificaron las regiones hipervariables V5-V6 del gen ribosomal 16S RNA empleando los *primers* degenerados 807F y 1050F, para obtener amplificadores de aproximadamente 300 pb. Los productos de la amplificación anterior fueron re-amplificados empleando el primer 807F (5'GGATTAGATACCCBRGTAGTC 3') unido a un único código de barras y a un adaptador para pirosecuenciación Roche 454 A y el primer 1050R (5'AGYTGDCGACRRCRTGCA 3') unido a un código de barras no único y al adaptador para pirosecuenciación Roche 454 B. La primera amplificación fue hecha a una temperatura de anillamiento constante de 53°C, mientras que la segunda amplificación fue hecha en 5 ciclos con un "touchdown" de 0.2°C por ciclo. Se separaron

los fragmentos por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1% p/v a 80V para comprobar la correcta amplificación. EL procedimiento descrito anteriormente fue un servicio prestado por la corporación CorpoGen Investigación y Biotecnología (<http://www.corpogen.org/>). Los fragmentos amplificados fueron enviados a *Environmental Genomics Core Facility* en la Universidad de Carolina del Sur, Estados Unidos de América, para ser secuenciados en la plataforma Roche FLX 454 (Armougom *et al.* 2009; Yu & Morrison 2004) . Las secuencias obtenidas fueron analizadas usando los protocolos informáticos establecidos por el Laboratorio de Micología y Patología de Plantas de la Universidad de los Andes (LAMFU). Primero se removieron las secuencias de baja calidad, definidas como aquellas con una longitud menos a 50 pb y una calidad menor a 20, luego se calculó la matriz de distancias y se asignaron los OTUs usando el programa DOTUR (Schloss & Handelsman 2005) con 0, 1, 3 y 5 % de diferencia para las curvas de rarefacción y los análisis de diversidad. Para hacer la asignación taxonómica se empleo la herramienta de clasificación del *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.* 2009) con más del 80% de confianza.

3.2.3 Identificación de algunas bacterias aisladas de la comunidad bacteriana asociada con el octocoral *Eunicea* sp.

Se re-suspendió una colonia de la bacteria en 100 ul de agua esterilizada, se llevó a 70-80 °C en un baño de agua por 10 min., se transfirió inmediatamente a un baño de hielo por 10 min., luego se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4°C y finalmente el ADN obtenido en el sobrenadante se separó mediante electroforesis en geles de agarosa para observar su calidad. El ADN total se utilizó para amplificar el gen ribosomal 16S empleando los *primers* universales 27F y 1492R (Lane 1991), para la amplificación se empleó 1 unidad de la ADN polimerasa Platinum® Pfx de Invitrogen, 0.4mM mezcla dNTPs y 0.6mM de sulfato de magnesio y las condiciones de la PCR fueron: 2 min a 95°C, seguidos por 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 56°C y 1.5 min a 72°C, seguidos por 10 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% p/v a 90V, para confirmar que los productos de PCR fueran los esperados según el marcador de peso molecular HyperLadder II. Los productos se enviaron a MacroGen® para su secuenciación. Las secuencias se alinearon usando el

programa ClustalX 2.0.10 (Larkin *et al.* 2007), Los dendogramas y las distancias p se construyeron y se determinaron empleando el programa MEGA 4.0. (Tamura *et al.* 2007).

3.2.4 Detección del subgrupo *Antifouling* en la comunidad bacteriana asociada con el octocoral *Eunicea* sp.

Para su detección se llevó a cabo una PCR con los *primers* Psalt815F y Antifouling995R, cuyas secuencias son AACGATGTCTACTAGAAGCTGG y TCTCTAGCGATTTCTCTGGATG (5'-3') respectivamente (Skovhus *et al.* 2007). Estos *primers* fueron usados sobre el producto de la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S total de la muestra del homogenizado del octocoral *Eunicea* sp., utilizado para la pirosecuenciación (numeral 3.2.2). Para la reacción de PCR se empleó 1 unidad de la ADN polimerasa Platinum® Pfx de Invitrogen, 0.4mM mezcla dNTPs y 0.6mM de sulfato de magnesio y las condiciones de la PCR fueron: 2 min. a 95°C, seguidos por 35 ciclos de 1 min. a 95°C, 1 min., a 58°C y 1.5 min a 72°C, seguidos por 10 min a 72°C. La PCR se llevó a cabo utilizando 1ul y 0,1 ul del producto de amplificación del gen ribosomal 16S total en 25ul de mezcla final. Los productos de PCR se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa de 1.8% p/v a 90V.

3.3 Inhibición de *Quorum Sensing* y antagonismo dentro de la comunidad bacteriana asociada con el *Eunicea* sp.

3.3.1 Pruebas de inhibición de *Quorum Sensing*

Para evaluar la actividad inhibitoria de QS de la comunidad bacteriana total que creció en los diferentes medios de cultivo, se enfrentaron cada una de las comunidades aisladas del octocoral *Eunicea* sp., a la bacteria *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 (biosensor) en la cual la producción del pigmento violeta, violaceína, está controlada por QS. Con la inhibición de la producción de violaceína se evaluó si la comunidad estudiada producía algún compuesto anti-QS, en este caso *C. violaceum* crecería sin pigmento con colonias blancas formando un halo de inhibición de la violaceína alrededor de la comunidad aislada o del aislamiento estudiado. También se observó si la comunidad aislada o el aislamiento estudiado producían algún compuesto con actividad

antimicrobiana, caso en el que la bacteria biosensora mostraría un halo de inhibición de crecimiento. Para lo anterior se emplearon dos métodos de evaluación, siembra en pozo del cultivo líquido de cada una de las comunidades frente al biosensor y el segundo método consistió en hacer una estría sobre el agar previamente plaqueado con el biosensor (Choo *et al.* 2006; McLean *et al.* 2004; Nithya *et al.* 2010). Para esto *C. violaceum* se cultivó en caldo ST por 18-24 h con agitación y las comunidades a ensayar fueron crecidas en los caldos correspondientes por 18-24 h, al cabo de éste tiempo fueron mezcladas con caldo fresco en una proporción 1:1 y se agregaron volúmenes de 30 y 60 ul de cada una de las comunidades estudiadas en los pozos, las cajas se incubaron a 26-28°C por 48 horas. Las bacterias aisladas de las comunidades bacterianas del octocoral (numeral 4.1.1.1) que mostraron actividad inhibidora de QS, fueron evaluadas utilizando los métodos anteriormente nombrados de forma individual. Todas estas pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

Los aislamientos bacterianos de la comunidad que mostró actividad inhibidora de QS, se caracterizaron empleando pruebas bioquímicas (Valencia 2004), por descripción morfológica tanto microscópica como macroscópica y por medio de la secuenciación del gen ribosomal 16S RNA.

3.3.2 Pruebas de antagonismo bacteriano con algunos aislamientos de la comunidad aislada en medio LB

Para detectar las relaciones antagónicas de crecimiento entre las bacterias de la comunidad aislada en LB provenientes del octocoral *Eunicea* sp., se hizo siembra en estría de los aislamientos ELB46, ELB9, ELB11, ELB18, ELB12, ELB42, ELB14, ELB53, ELB50, ELB35, ELB31, ELB44, ELB37, ELB38 y ELB48 frente a los 32 aislamientos obtenidos de la comunidad aislada en LB (numeral 4.1.1.1). Después de sembrados los aislamientos, se incubaron por 3 días a temperatura ambiente y se obtuvieron imágenes de los resultados obtenidos. La forma en la que se sembraron los aislamientos en el agar y se enfrentaron a los demás es mostrada en la figura 3-1.

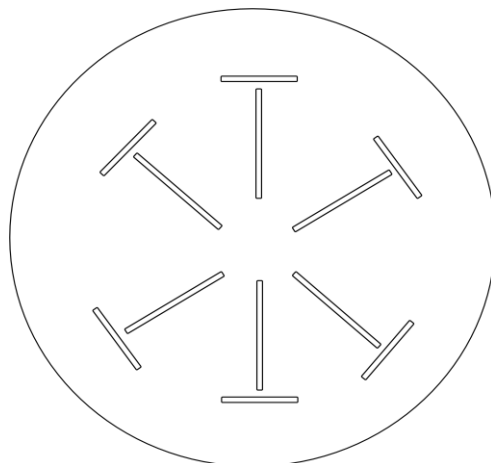


Figura 3-1: Representación de la siembra de los aislamientos para las pruebas de antagonismo. Las cepas probadas fueron aisladas, de la comunidad aislada en el medio de cultivo LB provenientes de la superficie del octocoral *Eunicea* sp.,. Las estrías se sembraron de forma perpendicular.

3.4 Estudio preliminar de extractos obtenidos del aislamiento ELB9, inhibidor de *Quorum Sensing*

3.4.1 Ensayos de crecimiento de uno de los aislamientos activos en medios de cultivo diluidos

Para este ensayo se utilizó uno de los aislamientos con mayor actividad inhibidora de QS, el ELB9. El medio LB, en el que crece el aislamiento, es complejo, por esta razón contiene muchas sustancias que interfieren con la extracción con solventes por polaridad. Para evitar estas interferencias, antes de la extracción, fue necesario probar medios diluidos de LB que permitieran el crecimiento de este microorganismo. Se inocularon 60ul de caldo de cultivo del aislamiento ELB9 de $OD_{600} = 0.400$ en 6 mL de caldo LB sin diluir y caldo LB diluido 5 (1 g/L extracto de levadura, 2g/L de triptona y 2 g/L de NaCl) y 10 veces (0.5g/L de extracto de levadura, 1g/L de triptona y 1g/L de NaCl) con agitación a 26-28°C por 24 h, de este cultivo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm cada 1 ó 2 horas, para determinar la curva de crecimiento del aislamiento en medio LB y en medio LB diluido 5 y 10 (Valencia 2004). Para lo anterior se prepararon 60 tubos, de los cuales se tomaba una muestra para cada medida, las medidas se tomaron en el espectrofotómetro Spectronic® Genesys™5.

3.4.2 Extracciones por polaridad del aislamiento ELB9, activo para inhibición de QS frente a *C. violaceum*

Una vez el medio fue elegido, el aislamiento ELB9 se incubó en LB diluido 10 veces por 24 horas a 26-28°C con agitación, tiempo en el cual éste llegó al final de la fase logarítmica (figura 4-15). Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos y se filtró el sobrenadante por filtro de membrana de 0.22 μ m. Al sobrenadante obtenido se le hicieron extracciones seriadas con n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y n-butanol mezclando volúmenes iguales de sobrenadante con solvente, a las fracciones resultantes se les evaporó el solvente con ayuda de un rotavapor. La fracción acuosa restante se liofilizó (Nithya *et al.* 2010; Wilson *et al.* 2010).

3.4.3 Ensayos de inhibición de QS con los extractos obtenidos de la extracción por polaridad del sobrenadante del aislamiento ELB9.

Los extractos secos obtenidos para las extracciones con n-hexano, diclorometano, n-butanol y del liofilizado del extracto acuoso fueron redisueltas con dimetilsulfoxido y el extracto seco obtenido de la extracción con acetato de etilo fue redisueltó en metanol. Las diluciones se hicieron de tal forma que quedaran a una concentración final de 100 μ g/ μ l y se impregnaron 3, 4 y 6 μ l por fracción en un sensidisco, este se puso sobre agar tripticasa de soya en el cual se había hecho una siembra masiva previa de *C. violaceum*. Las cajas se incubaron por 72 horas a 26-28°C y al cabo de este tiempo hicieron registros fotográficos.

4.Resultados

4.1 Caracterización molecular de la comunidad bacteriana asociada con los octocoral *Eunicea* sp., y *P. elisabethae*

4.1.1 Adaptación del método de hibridización fluorescente *in situ* (FISH)

4.1.1.1 Embalsamamiento de las células

Para determinar con cuál de los cuatro métodos empleados para la fijación de las muestras se obtenían mejores resultados (las soluciones fijadoras ensayadas fueron: 3 vol. de paraformaldehído 4% v/v, 1 vol. de etanol absoluto, 1 vol. de una mezcla de formaldehído al 37% (p/p) : ácido acético glacial (1:1), 1 vol. de una mezcla de metanol : formaldehído 37% (p/p) (9:1), se empleó una mezcla de *E. coli* y *S. aureus* crecido durante 16 horas, con una $OD_{600} = 0.300$. Como se muestra en la figura 4-1, el mejor resultado se obtuvo cuando se embalsamó la muestra ensayada con la solución de formaldehído 37% : ácido acético glacial (1:1), pues no se ven manchas de fluorescencia más claras alrededor de las células lo cual podría indicar la presencia de material genético alrededor, esta evidencia indica que las células quedaron correctamente embalsamadas, además las fotos obtenidas al utilizar la mezcla mencionada son más nítidas que cuando se usan las otras soluciones de embalsamamiento y por último, con este método sólo se requieren 15 minutos para la fijación de la muestra.

4.1.1.2 Análisis *in situ* FISH en láminas

Previo a la hibridización de las muestras de los octocorales estudiados y empleando el protocolo estándar para hacer FISH en láminas (sin las modificaciones al procedimiento realizadas en el numeral 3.2.1.3), se hicieron pruebas con una mezcla de *S. aureus* y

Ochrobactrum pseudogrignonense, esta última es una Alfa-proteobacteria. En un primer ensayo, se evidenció que la sonda para Alfa-proteobacteria estaba hibridizando correctamente pero la sonda utilizada para Eubacteria emitía muy poca señal, por lo cual se revisaron nuevamente las concentraciones de sonda empleadas y se encontró que la sonda para Alfa-proteobacteria, la cual está marcada con el fluorocromo Cascade Blue®, requiere de una concentración de 30 ng/ul mientras que la sonda para Eubacteria (marcada con Alexa Fluor® 488) debe estar en una concentración entre 50 y 100 ng/ul, por esta razón se emplearon 75 ng/ul (Roche Diagnostics 2002; N. Lee 2010). Después del cambio de concentraciones de las sondas, se hicieron hibridizaciones sobre la mezcla de las bacterias nombradas anteriormente y se encontraron señales azul agua marina para las Alfa-proteobacteria y señales verdes para *S. aureus*, lo que indicaba que la hibridización se estaba llevando a cabo satisfactoriamente.

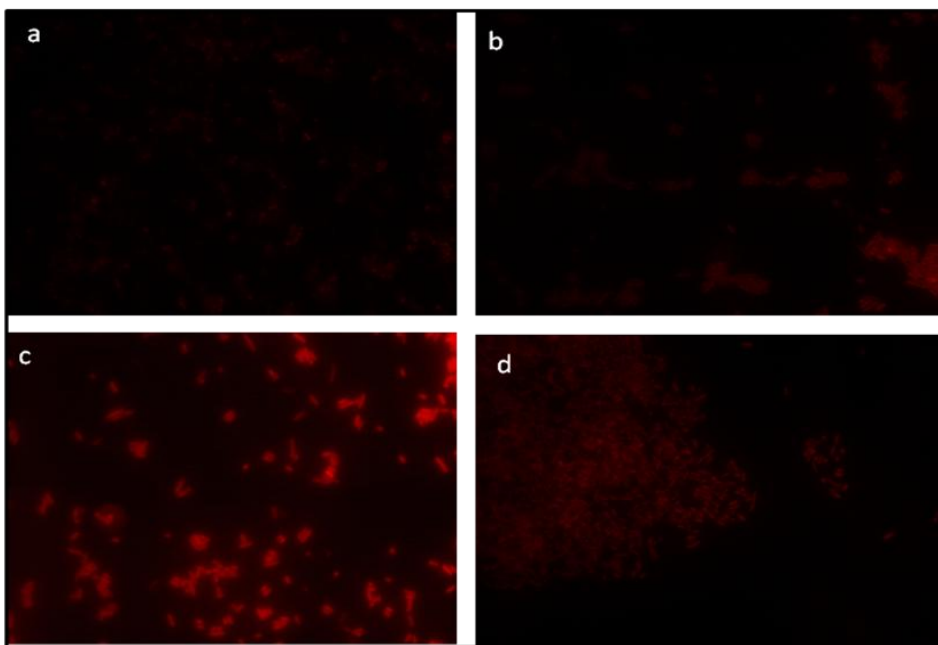


Figura 4-1: Embalsamamiento de un cultivo de *E. coli* y *S. aureus* de 16 horas de incubación en 4 soluciones fijadoras diferentes. a) Usando etanol absoluto, b) metanol / formaldehído, c) ácido acético / formaldehído y d) paraformaldehído. Fotos tomadas con un aumento de 100X, empleando filtro para rojo (emisión entre 592 a 675 nm).

Como parte del curso “*In Situ* Detection of Microbial Structure and Function in the Environment”, se hicieron hibridizaciones sobre la muestra del octocoral *Eunicea* sp.,

empleando las sondas EUBI, EUBII y EUBIII, pero no fue posible detectar alguna señal al microscopio, entonces se prepararon ensayos de CARD-FISH con el fin de amplificar la señal, a pesar de ésto tampoco se observó señal. Sin embargo es importante mencionar que en los dos casos anteriores se observaba fluorescencia de fondo, por esta razón fue necesario verificar que las muestras no fueran autofluorescentes. La ausencia de señal pudo ser debida a que las bacterias presentes en la muestra del octocoral se encontraban a una concentración menor a 10^5 células/mL, que es el límite de detección de la técnica; o a la baja actividad transcripcional de las bacterias presentes en esta muestra, resultando en una concentración insuficiente de sonda hibridizada al interior de la célula fijada. Otra razón pudo ser la pérdida de la biomasa en la deshidratación previa a la hibridización y/o en los lavados posteriores.

Para identificar cual de las anteriores había sido la causa de la falta de señal, se hizo una tinción con cristal violeta al 1% p/v de una muestra del octocoral y se contaron células por campo para descartar que la causa fuera una concentración de células menor al límite de detección de la técnica, además se verificó la autofluorescencia al microscopio. En el conteo de células por campo se encontró que en la muestra del octocoral sólo había aproximadamente 10 células por campo y se confirmó la presencia de autofluorescencia. Con los anteriores resultados se decidió concentrar la muestra empleando el método de McDonalds (N. Lee 2010) y también se hicieron hibridizaciones en tubos de 500ul para evitar la pérdida de biomasa que se estaba presentando durante el procedimiento.

4.1.1.3 Determinación de autofluorescencia de las muestras

Fue posible detectar autofluorescencia en las muestras de *P. elisabethae* con los diferentes tratamientos y de una muestra concentrada de *Eunicea* sp., como se observa en las imágenes mostradas en la figura 4-2. Los dos octocorales presentarán autofluorescencia y, para el caso de *P. elisabethae*, se ve que ésta se hace más fuerte cuando las muestras son tomadas raspando las ramas (figura 4-2a), en este tratamiento la autofluorescencia es evidente en los tres filtros utilizados. La intensidad de la autofluorescencia disminuye apreciablemente cuando la muestra es tomada de la suspensión de la solución de embalsamamiento en la que se encuentra el coral o de la suspensión resultante después de someter la muestra embalsamada a ultrasonido. En los últimos dos tratamientos no se ve fluorescencia apreciable con el filtro azul. Para el octocoral *Eunicea* sp., se observa autofluorescencia en los tres filtros (figura 4-2d), pero

su intensidad es menor comparada con la autofluorescencia observada en la muestra sin concentrar del octocoral (imágenes no mostradas). En esta determinación, también se observó que los mejores tiempos de exposición para disminuir la autofluorescencia sin perder la señal de la sonda empleada, fueron 1/4" para las muestras del octocoral *Eunicea* sp., y 1/2" para las muestras de *P. elisabethae*.

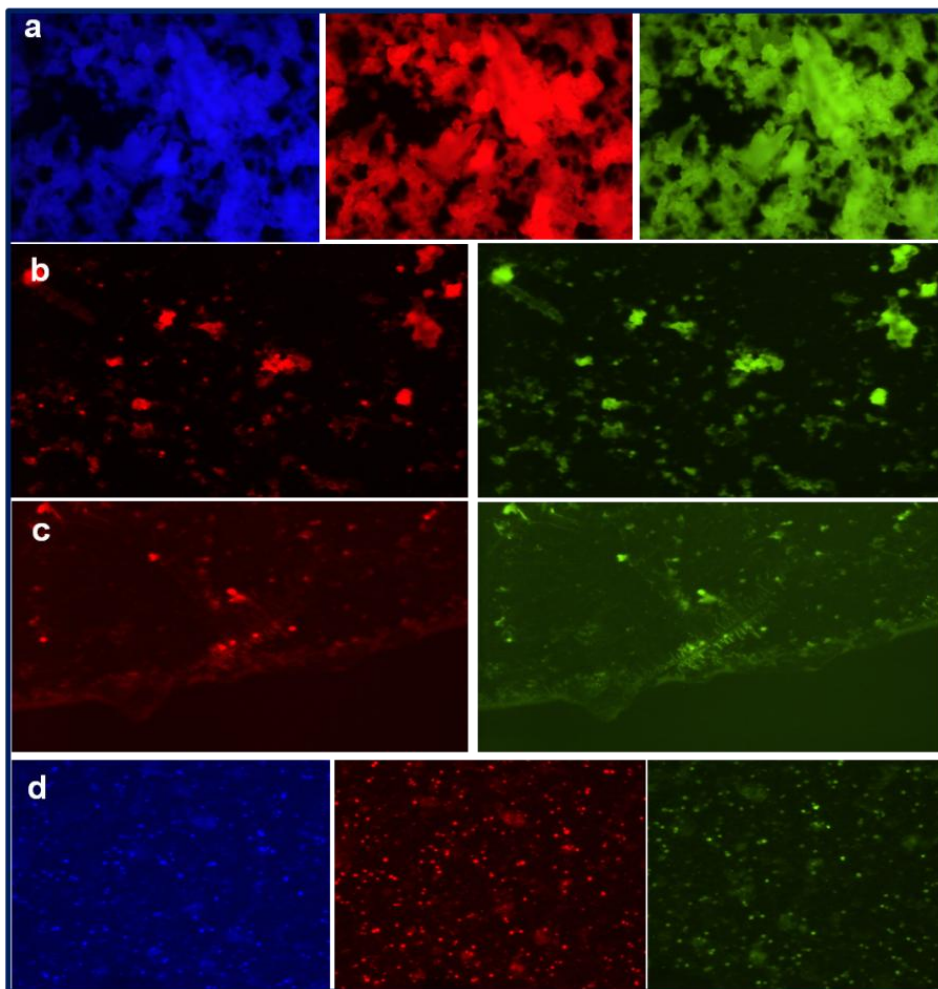


Figura 4-2: Autofluorescencia de las muestras de *P. elisabethae* y *Eunicea* sp. Muestra de *P. elisabethae* embalsamada tratada de tres formas diferentes. a) Raspado de ramas del coral resuspendido en PBS, b) ultrasonido de ramas del octocoral, c) muestra de lo que se encontraba suspendido en el medio de embalsamamiento de la muestra. d) Autofluorescencia del macerado de la muestra de *Eunicea* sp. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio óptico de fluorescencia Carl Zeiss® Axiophot, con un objetivo de aumento de 100X Plan Neo-fluor Zeiss®, con el juego filtros F2. En los casos en los que no se muestra la autofluorescencia en azul es porque ésta no se presentaba.

4.1.1.4 Análisis *in situ* FISH en tubos

Teniendo en cuenta los anteriores resultados se hicieron hibridaciones en tubos de la muestra del octocoral *P. elisabethae* con los tres tratamientos y de la muestra concentrada de *Eunicea* sp., para evitar la pérdida considerable de biomasa durante las deshidrataciones previas a la hibridización. De este ensayo, se obtuvieron las imágenes mostradas en la figura 4-3. En estas imágenes se observa que hay varias señales de Alfa-proteobacteria, las cuales se ven azul agua marina (sonda para Alfa-proteobacteria marcada un fluorocromo azul más la señal verde la sonda para Eubacteria), pero también hay señales para Eubacteria (verde). Aunque haciendo FISH en tubos se reducía la pérdida de biomasa observada cuando se hacía FISH en láminas, en muchos de los campos observados se encontraba poca biomasa.

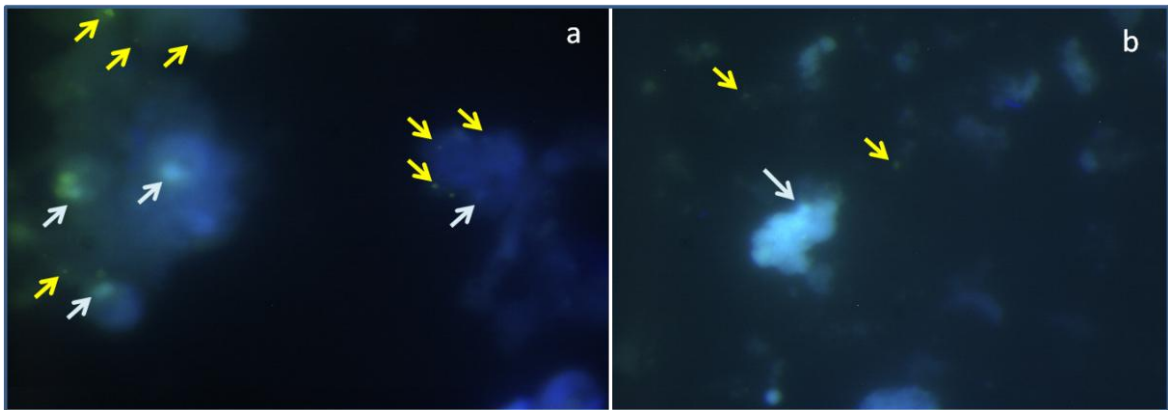


Figura 4-3: FISH empleando las sonda para Eubacteria y para Alfa-proteobacteria, sobre muestras de *P. elisabethae* y *Eunicea* sp. Empleando las sondas EUB338 para Eubacteria marcada con Alexa488 y ALF443 con Cascade Blue®, se muestran las imágenes obtenidas de la hibridización sobre a) muestra del material suspendido en el medio de embalsamamiento de *Pseudopterogorgia elisabethae* y b) Muestra concentrada del octocoral *Eunicea* sp. Las flechas en amarillo muestran las posibles señales para Eubacteria (verdes) y las flechas en blanco muestran las posibles señales para Alfa-proteobacteria. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio Zeiss® Axiophot, con un objetivo de aumento de 100X Plan Neo-fluor Zeiss®, empleando el juego filtros F2. Imágenes obtenidas a 1/4" de exposición para la muestra de *Eunicea* sp., y 1/2" para la muestra de *P. elisabethae*. Las imágenes se analizaron empleando el programa Lucia® 5.3.

4.1.2 Hibridización fluorescente *in situ* (FISH) para las muestras de los octocorales *Eunicea* sp., y *P. elisabethae*

Empleando el procedimiento descrito en el numeral 3.2.1.3 con sus modificaciones, se hicieron hibridaciones con sondas para Beta y Gamma-proteobacteria para hacer un análisis más completo de la composición de la comunidad bacteriana asociada con la superficie de los octocorales estudiados. Estas últimas hibridaciones para la muestra concentrada de *Eunicea* sp., se hicieron adicionando las sondas para Eubacteria, Alfa y Gamma-proteobacteria simultáneamente, pero en todos los intentos se obtuvieron conteos para cada una de las señales muy similares, tratándose en su mayoría de autofluorescencia de la muestra. En la figura 4-4 se observan imágenes obtenidas para este ensayo de un mismo campo, en los tres filtros con cada una de las sondas, en ellas se ven las mismas señales para las tres imágenes. En esta figura también se observan los perfiles de estas imágenes (gráfica de pixeles en el eje X vs. Intensidad), en los que se confirma que los pixeles en el eje X en los que hay señal son los mismos para las tres imágenes.

Ya que no fue posible obtener resultados de la hibridación *in situ* para el octocoral *Eunicea* sp., debido a la autofluorescencia innata de este organismo (figura 4-4), se llevo a cabo una hibridación sobre la muestra del *P. elisabethae* proveniente de lo que se encontraba suspendido en el medio de fijación de la muestra del octocoral, en la cual se observó menos autofluorescencia (figura 4-2c), los resultados obtenidos en este experimento se muestran en las figuras 4-5 y 4-6 y en la tabla A-1. En la figura 4-5 se observa que la mayoría de las bacterias asociadas a la superficie de este octocoral corresponden a Gamma-proteobacterias en un 42%, seguidas por Alfa-proteobacterias con 33% y en menor proporción se encuentran Beta-proteobacterias con un 16%. Algunas de las imágenes que fueron analizadas para cada una de las sondas se muestran en la figuras A1-1, A1-2 y A1-3.

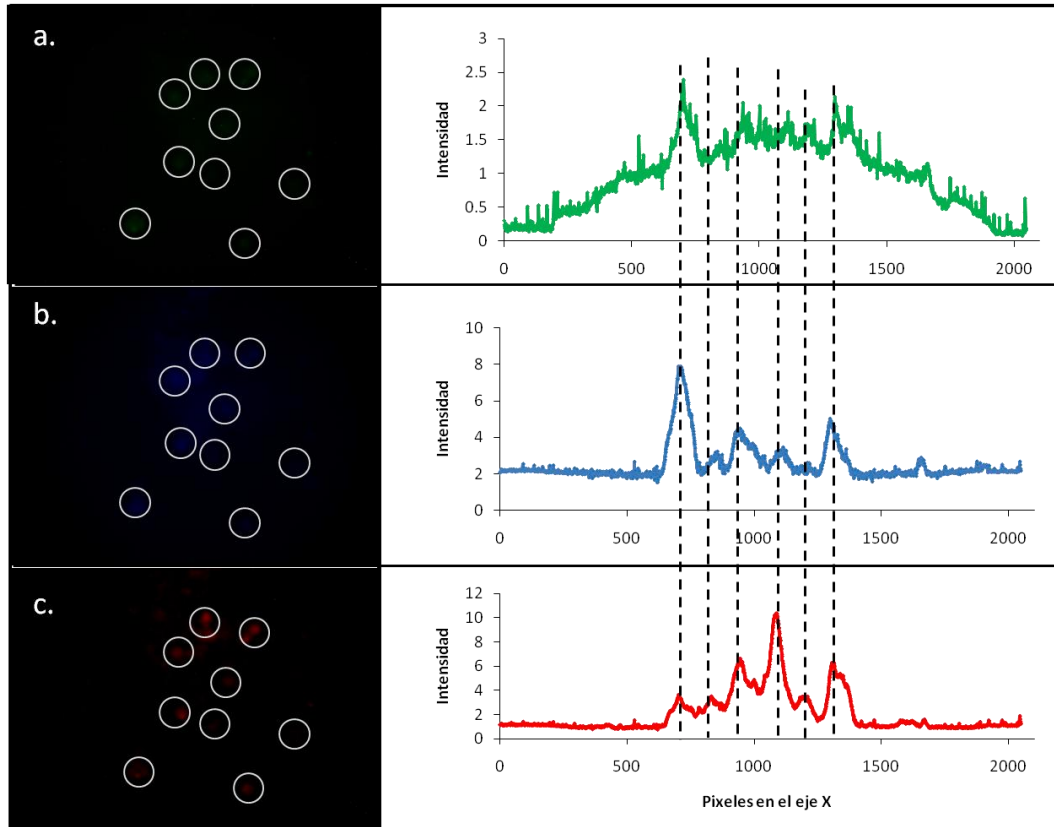


Figura 4-4: FISH sobre una muestra concentrada del octocoral *Eunicea* sp., empleando sondas para Eubacteria, Alfa y Gamma-proteobacteria. Sonda EUB338 para Eubacteria marcada con Alexa488, ALF443 para Alfa-proteobacteria marcada con Cascade Blue® y para Gamma-proteobacteria, GAM42a con Alexa 594. Se muestran las imágenes obtenidas empleando los filtros: a. verde para observar la sonda EUB338, b. azul para observar la sonda ALF443 y c. rojo para observar la sonda GAM42a. En cada una de las imágenes están marcadas con un círculo las señales que son iguales para los tres casos. Al lado derecho de cada imagen se muestran las gráficas de Intensidad vs. píxeles en el eje X, en las que se evidencian las señales que son iguales para los tres casos. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio Zeiss® Axiophot, con un objetivo de aumento de 100X Plan Neo-fluor Zeiss®, empleando el juego filtros F2 y a 1/4" de exposición. Imágenes analizadas con el software Image J.

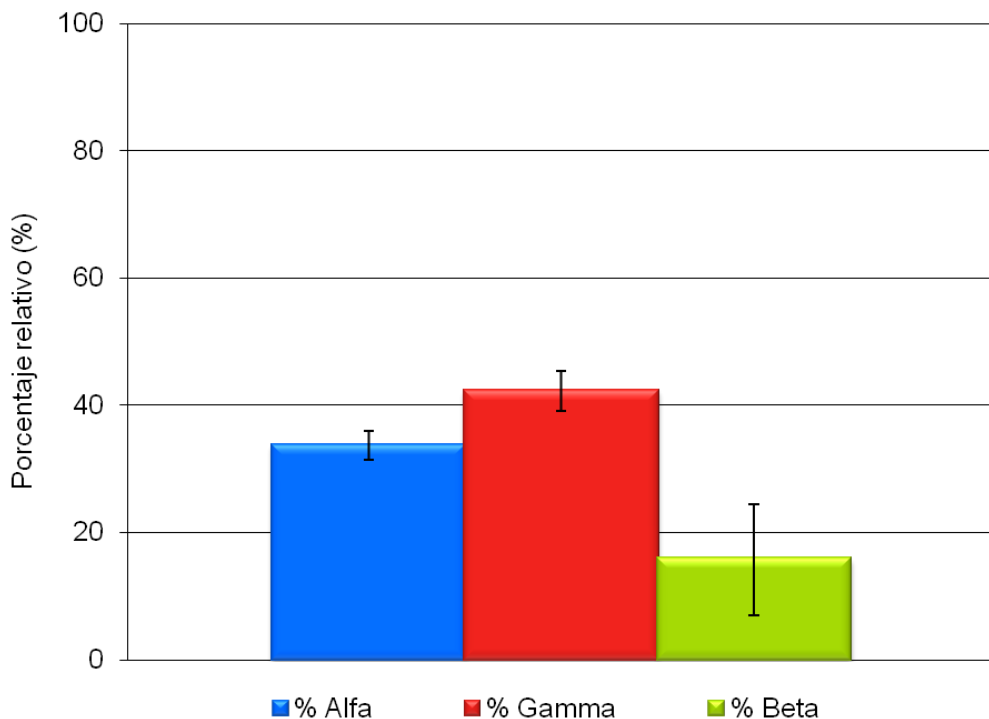


Figura 4-5: Abundancia relativa de clases bacterianas asociadas al octocoral *P. elisabethae*. Resultados provenientes de conteos de 10 fotos para las imágenes de las hibridaciones hechas con las sondas EUB338 y ALF443 y EUB338 y GAM42a. Para obtener los resultados del porcentaje de Beta-proteobacteria se hicieron 10 conteos de imágenes de la hibridación con la sonda BET42a y EUB338 por separado.

4.1.3 Análisis *in situ* por pirosecuenciación del gen ribosomal 16S RNA

Como resultado de la pirosecuenciación se obtuvieron aproximadamente 21854 secuencias para las regiones hipervariables V5-V6 del gen ribosomal 16S. Se escogieron estas regiones porque su combinación, si bien no es específica para definir el nivel de especie o género, permite medir la diversidad microbiana de una muestra debido a su alta variabilidad (Claesson *et al.* 2009). En la figura 4-7 se muestra la curva de rarefacción obtenida para el número de secuencias resultantes, en la que para los tres porcentajes de similitud escogidos, se alcanza la saturación antes de las 10000 secuencias, lo que demuestra que el número de secuencias obtenido corresponde a una muestra representativa de las bacterias asociadas con el octocoral estudiado.

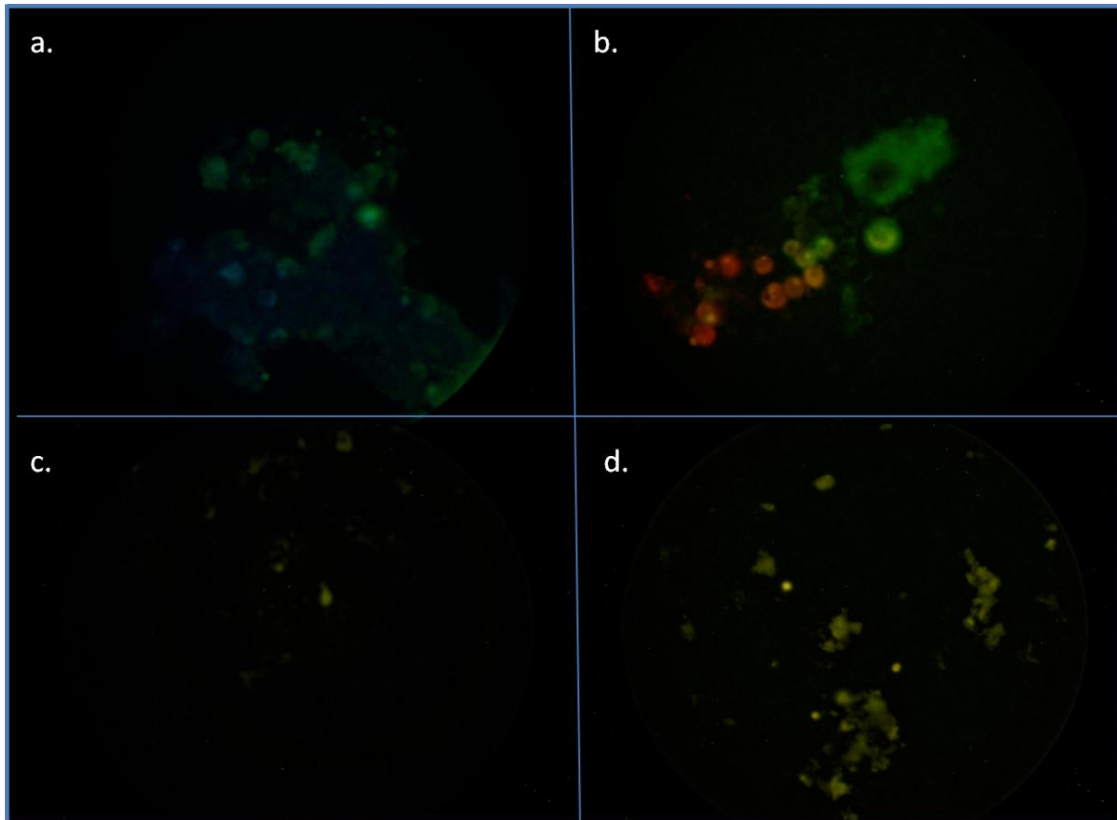


Figura 4-6: FISH sobre una muestra del material suspendido del octocoral *P. elisabethae*, empleando sondas para Eubacteria, Alfa, Gamma y Beta-proteobacteria. Hibridizaciones hechas empleando las sondas EUB338 para Eubacteria marcada con Alexa488, ALF443 paracon Cascade Blue®, GAM42a para con Alexa 594 y BET42a para con Alexa 532. Se muestran las imágenes obtenidas para las hibridizaciones: a. muestra del octocoral con las sondas EUB338 y ALF443, b. muestra del octocoral con las sondas EUB338 y GAM 42a, c. muestra del octocoral con la sonda BET42a y d. muestras del octocoral con la sonda EUB338. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio Zeiss® Axiophot, con un abjetivo de aumento de 100X Plan Neo-fluor Zeiss®, empleando el juego filtros F2 y a 1/2" de exposición. En todos los casos las imágenes fueron analizadas y sobrepuestas con la ayuda del programa Image J.

En la figura 4-8 se observan las abundancias relativas de las phyla bacterianas encontradas en la muestra del octocoral *Eunicea* sp., en esta figura la gran mayoría de las bacterias presentes en la muestra son Proteobacterias y bacterias sin clasificar y en menor porcentaje se encuentran Actinobacterias, Firmicutes y Tenericutes. En la figura 4-9 están representadas las clases de proteobacterias encontrados en la muestra, como se observa, la mayoría de las Proteobacterias son Gamma-proteobacterias conocidas y

Gamma-proteobacteria sin clasificar, también se encuentra en un alto porcentaje las Beta-proteobacteria y en un bajo porcentaje las Alfa-proteobacterias.

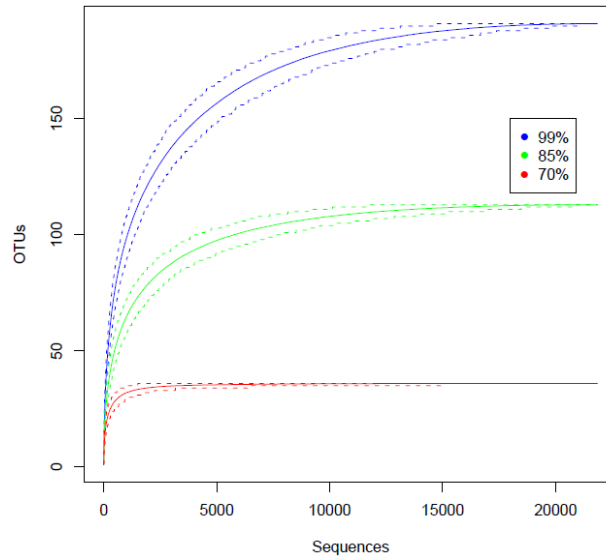


Figura 4-7: Curva de rarefacción. Obtenidas para la pirosecuenciación hecha a una muestra de ADN total proveniente del macerado en PBS de una muestra del octocoral *Eunicea* sp. En azul se muestra la curva hecha con un porcentaje de similitud del 99%, en verde del 85% y en rojo del 70%. Análisis hecho utilizando el programa DOTUR.

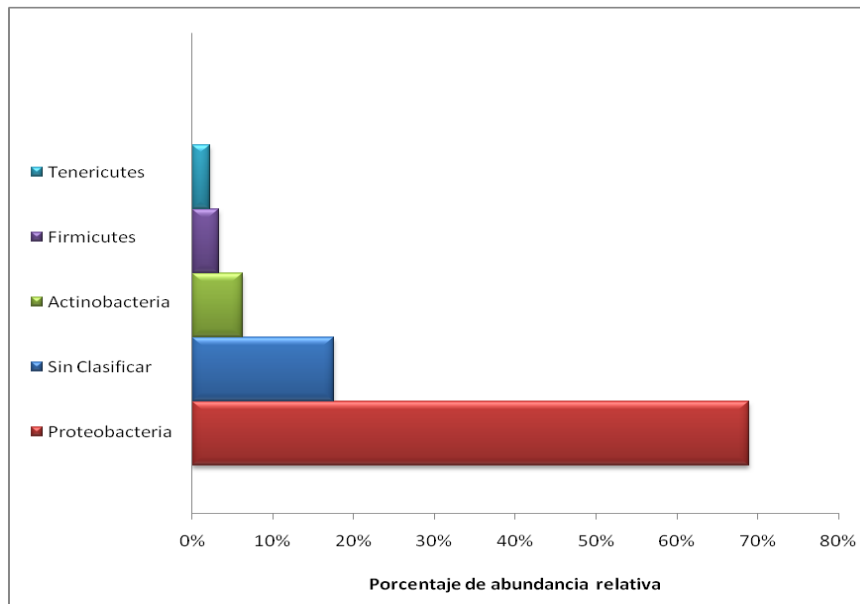


Figura 4-8: Abundancia relativa de phyla bacterianos asociados con el octocoral *Eunicea* sp. Asignación taxonómica hecha con la herramienta classifier del Ribosomal Database Project (98% de confianza. La asignación de OTUs fue realizada con Dotur) .

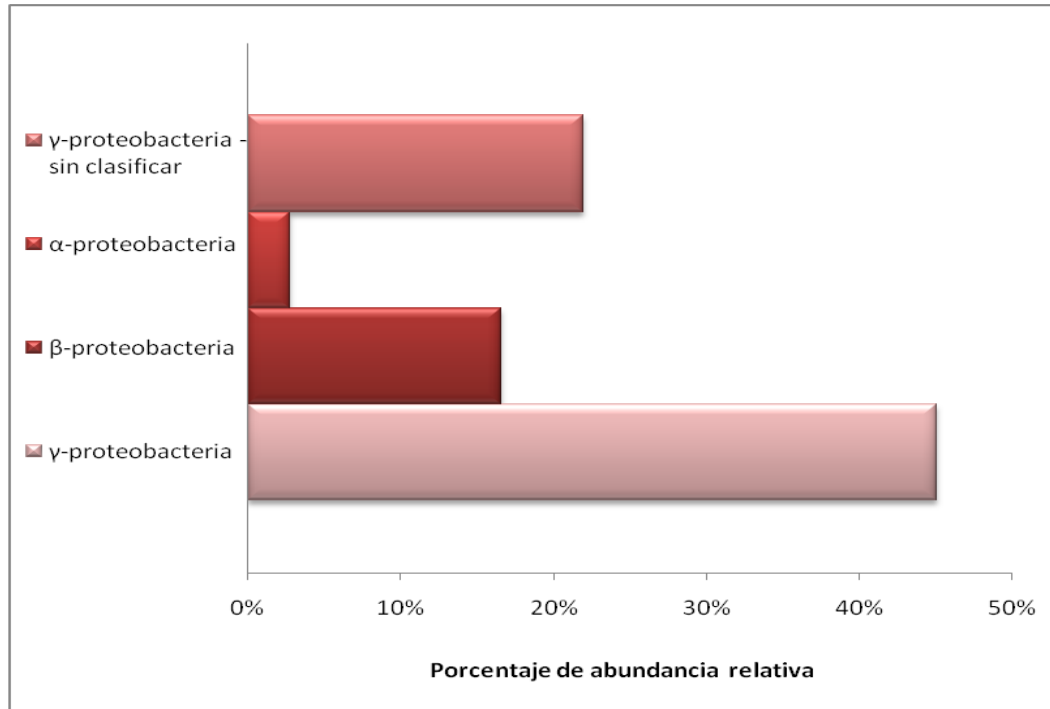


Figura 4-9: Abundancia relativa de proteobacterias asociadas al octocoral *Eunicea* sp. Asignación taxonómica hecha con la herramienta classifier del Ribosomal Database Project (98% de confianza. La asignación de OTUs fue realizada con Dotur).

4.1.4 Identificación de algunas bacterias aisladas de la comunidad bacteriana asociada con el octocoral *Eunicea* sp.

Los aislamientos seleccionados para la secuenciación del gen ribosomal 16S RNA fueron ELB9, ELB11, ELB42, ELB31, ELB50, ELB12, ELB14, ELB18, ELB53, ELB34, ELB37, ELB41, ELB46 y ELB48. Un ejemplo de los fluorogramas obtenidos para la secuenciación de estas cepas se muestra en la figura C-1, en el que se evidencia que las secuencias obtenidas provenían de muestras puras. Estos aislamientos se escogieron porque presentan actividad inhibidora de QS, antagonismo o tienen alguna característica morfológica que las hace diferentes, como el aislamiento ELB34 que se encogió porque sus colonias son de color amarillo a diferencia de muchas otras colonias aisladas. En las tablas 5 y 6 se observan los aislamientos con actividad inhibidora de QS o antagonista. Con las secuencias obtenidas se construyó el dendograma mostrado en la figura 4-10.

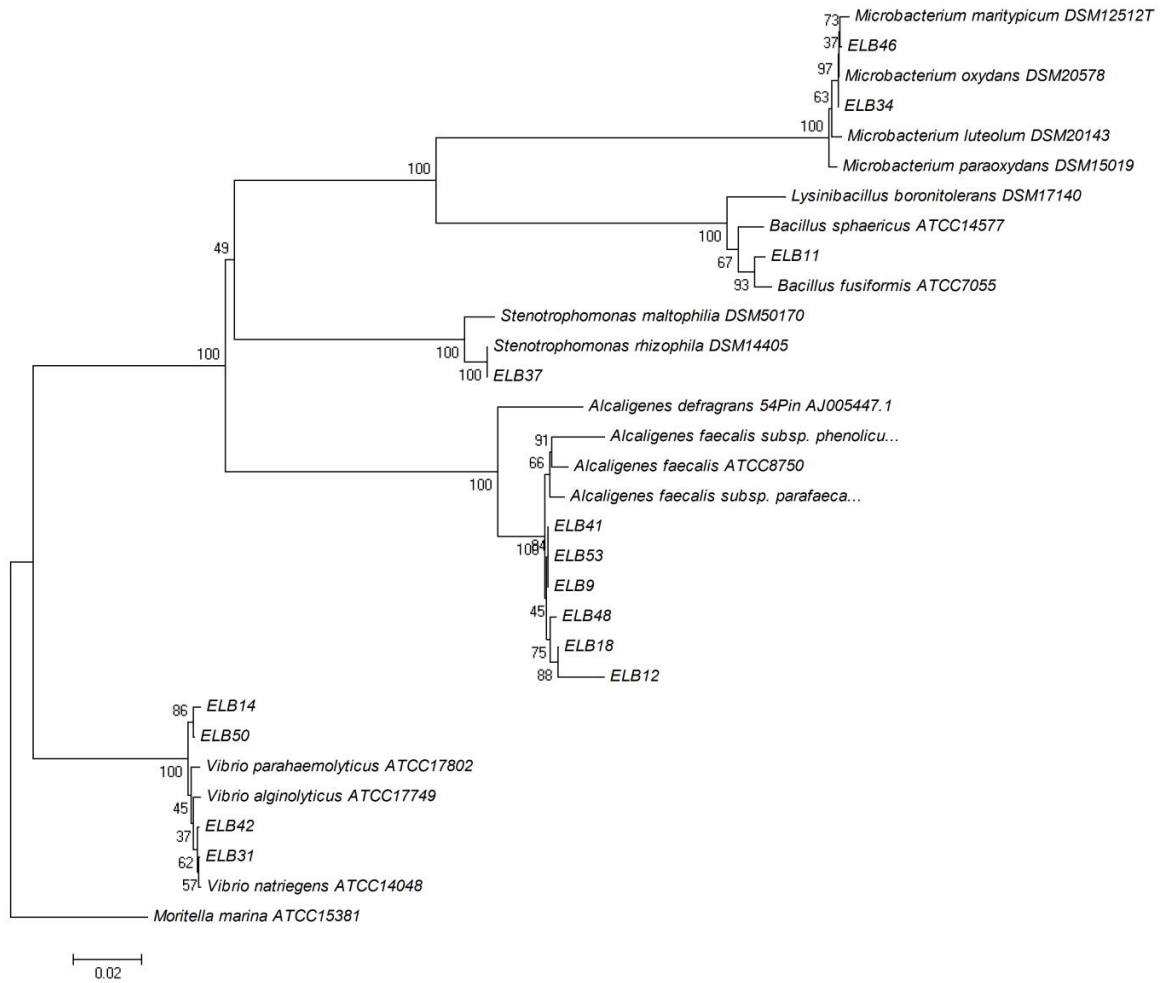


Figura 4-10: Dendrograma construido a partir de las secuencias del gen ribosomal 16S RNA obtenidas para los aislamientos ELB9, ELB11, ELB14, ELB18, ELB31, ELB34, ELB35, ELB37, ELB41, ELB42, ELB46, ELB48, ELB50 y ELB53 de la comunidad aislada en el medio de cultivo LB, utilizando como algoritmo de agrupamiento Neighbor Joining y como matriz de distancias Kimura 2 parámetros. Los números en los nodos representan los valores de bootstrap en porcentaje basados en 1000 repeticiones. La información de las secuencias empleadas y de los alineamientos hechos con éstas, para la construcción de éste dendrograma, se muestran en la figura C-2 y la tabla C-1.

Según el dendrograma mostrado en la figura 4-10, los porcentajes de similitud y distancia p mostrados en la tabla 4-1 y los resultados de las pruebas bioquímicas (Holt *et al.* 1994) mostrados en la tabla C-2, los aislamientos ELB9, ELB12, ELB18, ELB41, ELB48 y ELB53 corresponden a la especie *Alcaligenes faecalis*, el aislamiento ELB11 a *Bacillus fusiformis*, los aislamientos ELB31, ELB14, ELB42 y ELB50 corresponden al género

Vibrio, los aislamientos ELB34 y ELB46 al género *Microbacterium* y el aislamiento ELB37 a *Stenotrophomonas rhizophila*.

Tabla 4-1: Morfología, distancia p y porcentaje de similitud para trece bacterias aisladas del octocoral *Eunicea* sp.

Aislamiento	Gram	Morfología	Especies con similitud >98%	Distancia p	% de similitud
ELB9	-	Bacilo	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.005	99.5
			Aislamiento ELB18	0.003	99.7
			Aislamiento ELB53	0.000	100
			Aislamiento ELB48	0.002	99.8
ELB11	-	Bacilo	<i>Bacillus fusiformis</i>	0.004	99.6
ELB12	-	Bacilo	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.019	98.1
			Aislamiento ELB18	0.014	98.6
			Aislamiento ELB48	0.018	98.2
ELB14	-	Bacilo	Aislamiento ELB31	0.000	100
			Aislamiento ELB50	0.000	100
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.006	99.4
			<i>Vibrio alginolitycus</i>	0.007	99.3
			<i>Vibrio natrigens</i>	0.004	99.6
ELB18	-	Bacilo	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.009	99.1
			Aislamiento ELB48	0.003	99.7
			Aislamiento ELB53	0.003	99.7
			Aislamiento ELB41	0.003	99.7
			Aislamiento ELB9	0.003	99.7
ELB31	-	Bacilo	Aislamiento ELB42	0.000	100
			Aislamiento ELB50	0.000	100
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.009	99.1
			<i>Vibrio alginolitycus</i>	0.002	99.8
			<i>Vibrio natrigens</i>	0.000	100
ELB34	-	Bacilo	<i>Microbacterium maritpicum</i>	0.002	99.8
			<i>Microbacterium oxydans</i>	0.002	99.8
			<i>Microbacterium luteolum</i>	0.003	99.7
			Aislamiento ELB46	0.001	99.9
ELB37	-	Bacilo	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0.000	100
ELB41	-	Bacilo	<i>Alcaligenes defragrans</i>	0.005	99.5
			<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.004	99.6
			Aislamiento ELB48	0.003	99.7
			Aislamiento ELB18	0.003	99.7
			Aislamiento ELB53	0.000	100
ELB42	-	Bacilo	Aislamiento ELB31	0.000	100
			Aislamiento ELB50	0.000	100
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.009	99.1
			<i>Vibrio alginolitycus</i>	0.002	99.8
			<i>Vibrio natrigens</i>	0.000	100

Tabla 4-1: (Continuación)

ELB 46	-	Bacilo	<i>Microbacterium maritypicum</i>	0.005	99.5
			Aislamiento ELB34	0.001	99.9
ELB48	-	Bacilo	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.009	99.1
			Aislamiento ELB18	0.003	99.7
			Aislamiento ELB53	0.003	99.7
			Aislamiento ELB41	0.003	99.7
			Aislamiento ELB9	0.003	99.7
ELB50	-	Bacilo	Aislamiento ELB31	0.000	100
			Aislamiento ELB42	0.000	100
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.009	99.1
			<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.002	99.8
			<i>Vibrio natrigens</i>	0.000	100
ELB53	-	Bacilo	<i>Alcaligenes defragrans</i>	0.005	99.5
			<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.004	99.6
			Aislamiento ELB48	0.003	99.7
			Aislamiento ELB18	0.003	99.7

Los datos fueron obtenidos de tinción de Gram, microscopia y análisis de las secuencias del gen ribosomal 16S RNA, la distancia utilizada para calcular la similitud fue la distancia p.

Como se mencionó anteriormente solo algunos aislamientos que tenían actividad inhibidora de QS (IQS) fueron caracterizados por secuenciación del gen ribosomal 16S RNA, sin embargo se construyó un cepario con los 92 aislamientos recolectados en los diferentes medios de cultivo, de estos el 90% son bacilos Gram negativos, el 1% cocos Gram negativos, el 4% cocos Gram positivos y el 5% bacilos Gram positivos. Hasta el momento se cuenta con la caracterización morfológica macro y microscópica y su respectiva caracterización bioquímica. En la tabla C-2 se encuentra el resumen de la caracterización de este cepario que está disponible para la comunidad académica.

4.1.5 Detección del subgrupo *Antifouling* en la comunidad bacteriana asociada con el octocoral *Eunicea* sp.

Se realizó PCR utilizando los *primers* reportados por Skovhus *et al.* (2007), para la detección del subgrupo *Antifouling* conformado por las especies bacterianas *Pseudoalteromonas tunicata* y *P. ulva*, el producto esperado tenía un tamaño de 180 pb, sin embargo en esta reacción no se obtuvieron amplificadas (Skovhus *et al.* 2007). El gel de electroforesis obtenido para esta amplificación se muestra en la figura 4-11.

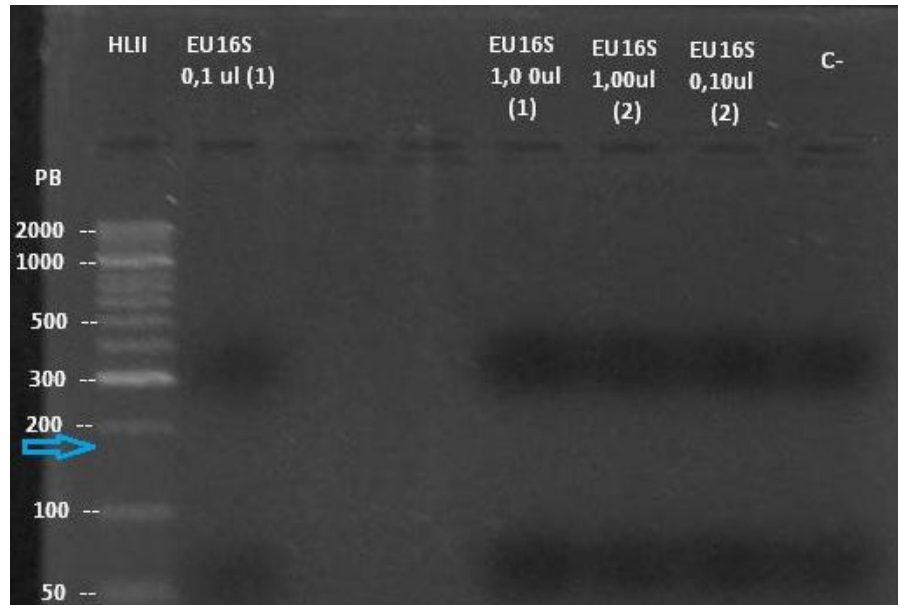


Figura 4-11: Gel de electroforesis del producto de PCR del grupo *Antifouling*. Imagen del gel de agarosa al 1.8% (p/v) obtenido de la electroforesis de los fragmentos producto de la amplificación por PCR de una secuencia específica a las especies bacterianas *Pseudoalteromonas tunicata* y *P. ulva*, las cuales hacen parte del grupo *antifouling*. PB hace referencia a pares de bases, HLII al marcador de peso Hyperladder II, EU16S es el producto de la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S total de la muestra del homogenizado del octocoral *Eunicea* sp., y C- al control negativo.

4.2 Inhibición de *Quorum Sensing* y antagonismo dentro de la comunidad bacteriana asociada con el *Eunicea* sp.

4.2.1 Pruebas de inhibición de *Quorum Sensing*

En las pruebas de inhibición de QS hechas a las comunidades bacterianas aisladas en los 4 medios de cultivo empleados, se encontró que sólo la comunidad aislada en el medio LB mostraba un halo de inhibición de la violaceína cuando ésta se enfrentaba al biosensor *C. violaceum*. Es evidente que esta comunidad sintetiza compuestos que inhiben la comunicación bacteriana por QS sin inhibir el crecimiento normal de *C. violaceum*, ya que en la vecindad de la estría de la comunidad aislada las colonias son de color blanco y no violeta. En la figura 4-12 se muestran las imágenes obtenidas para este ensayo.

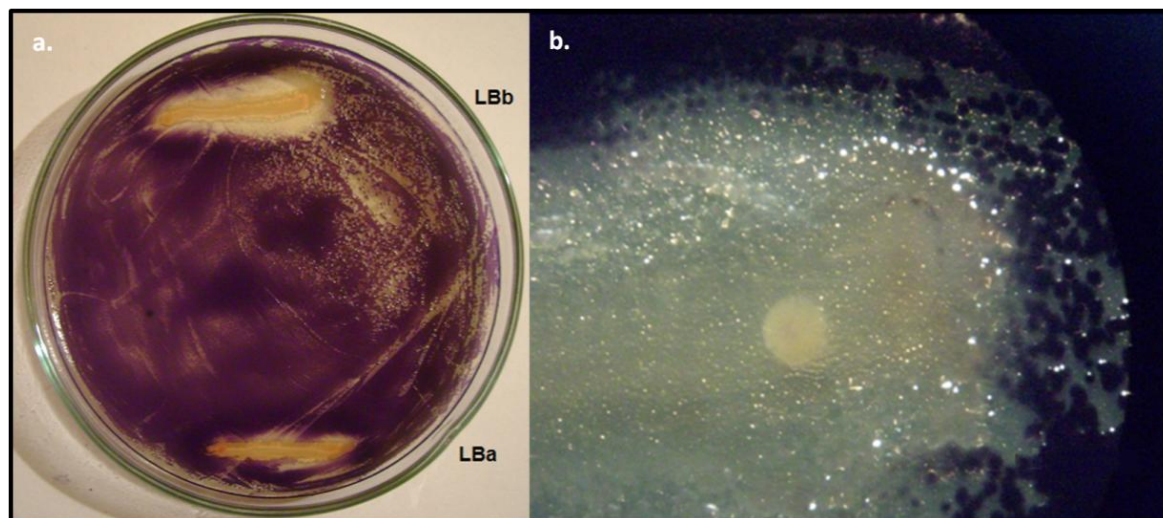


Figura 4-12: Prueba de inhibición de QS para la comunidad bacteriana aislada en el medio de cultivo LB, perteneciente al octocoral *Eunicea* sp., ensayo hecho utilizando como bacteria biosensora *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. a. Imagen de la caja de Petri en la que se muestra el halo de inhibición de la violaceína alrededor de la estría de la comunidad estudiada. b. Imagen ampliada a 5X de la vecindad de la estría correspondiente a LBb (mostrada en a.), en la que se observan las colonias de *C. violaceum* que crecieron alrededor de la estría, pero que no expresaron el pigmento violeta resultando en colonias blancas.

Debido a que la comunidad aislada en el medio de cultivo LB mostró actividad inhibidora de QS, sus aislamientos fueron sometidos a pruebas de inhibición y se encontró que 13 de los 32 aislamientos bacterianos obtenidos para este medio de cultivo, presentan actividad inhibidora de QS. Algunos de los halos de inhibición obtenidos por estos aislamientos en el ensayo de pozo y estría son mostrados en la figura 4-13. Los aislamientos con actividad inhibidora de QS fueron ELB9, ELB11, ELB14, ELB18, ELB31, ELB35, ELB37, ELB41, ELB42, ELB46, ELB48, ELB50 y ELB53. Los resultados obtenidos para los aislamientos en los que se observó actividad inhibidora de QS se muestran en la tabla 4-2 y al lado de ellos se muestra de forma cualitativa que tan marcada fue la actividad inhibidora de QS observada.

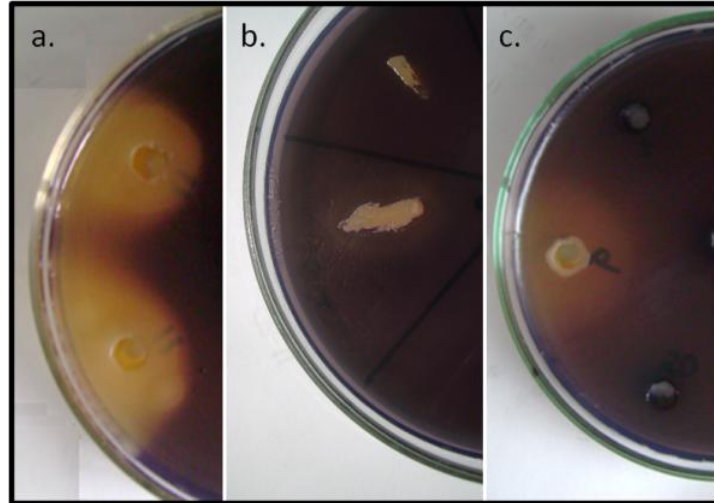


Figura 4-13: Prueba de inhibición de QS para algunos aislamientos bacterianos de la comunidad cultivada en LB, pertenecientes a la superficie del octocoral *Eunicea* sp., ensayo hecho utilizando como bacteria biosensora *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. a. Imagen de la caja de Petri en la que se muestra el halo de inhibición de la violaceína alrededor de los pozos en los que se adicionaron 30 (arriba) y 60 ul (abajo) del aislamiento ELB11 crecido en caldo LB. b. Imagen de la caja de Petri en la que se muestra el halo de inhibición de la violaceína alrededor de la estría del aislamiento ELB9 crecido en caldo LB. c. Imagen de la caja de Petri en la que se muestra el halo de inhibición de la violaceína alrededor del pozo en el que se adicionaron 30 ul del aislamiento ELB9 crecido en caldo LB.

Tabla 4-2: Clasificación cualitativa de la prueba de inhibición de QS de los aislamientos bacterianos obtenidos de la comunidad aislada en LB

Aislamiento	Morfología	Gram	IQS
ELB9	Bacilo	-	+++
ELB11	Bacilo	-	+++
ELB14	Bacilo	-	++
ELB18	Bacilo	-	+++
ELB31	Bacilo	-	+
ELB35	Bacilo	-	+
ELB37	Bacilo	-	+
ELB41	Bacilo	-	++
ELB42	Bacilo	-	+++
ELB46	Bacilo	-	+
ELB48	Bacilo	-	+
ELB50	Bacilo	-	+
ELB53	Bacilo	-	+++

IQS hace referencia a lo observado en las pruebas de inhibición de QS. + indica una actividad IQS baja con halos de inhibición tenues y diámetros pequeños (halos <1,3 cm),. ++ indica una actividad de IQS mediana, con halos de inhibición incipientes y diámetros mayores (halos entre 1,3 y 2,0 cm). +++ indica una actividad de IQS relevante, con halos de inhibición pronunciados y diámetros grandes (halos >2,0 cm).

4.2.2 Pruebas de antagonismo bacteriano con algunos aislamientos de la comunidad aislada en medio LB

En la figura 4-14 se muestran algunas de las pruebas positivas para los ensayos de antagonismo hechos a algunos de los aislamientos de la comunidad aislada en el medio de cultivo LB. Los resultados de estas pruebas se resumen en la tabla 4-3, en esta tabla se muestra en verde la actividad antagonista de los aislamientos estudiados frente a las bacterias aisladas en el medio de cultivo LB, en general los aislamientos con actividad antagonista son ELB9, ELB51, ELB12, ELB35, ELB18, ELB53, ELB42, ELB22, ELB38 y ELB43.

Tabla 4-3: Resultados para la prueba de antagonismo de las bacterias aisladas del octocoral *Eunicea* sp.

		AISLAMIENTOS ENFRENTADO																																		
		ELB	46	32	23	31	41	47	8	25	9	1	10	34	11	22	37	38	44	43	4	42	53	50	35	12	28	48	18	51	24	14	7	29		
BACTERIAS PROBADAS PARA ACTIVIDAD ANTAGONISTA	46																																			
	9																																			
	11																																			
	18																																			
	12																																			
	42																																			
	14																																			
	53																																			
	50																																			
	35																																			
	31																																			
	43																																			
	22																																			
	51																																			
	38																																			

En la tabla 4-3 se muestran en verde los aislamientos para los que se evidenció actividad antagonista cuando se enfrentaron a otros aislamientos de la muestra del octocoral *Eunicea* sp., cultivada en medio LB. Aunque la mayoría de los resultados fueron obtenidos de enfrentamientos planeados, también se encontraron evidencias de antagonismo entre aislamientos que fueron sembrados uno al lado de otro de forma no intencional, como el mostrado en la figura 4-14(a) en el que se observa antagonismo entre los aislamientos ELB11, ELB43 y ELB44.

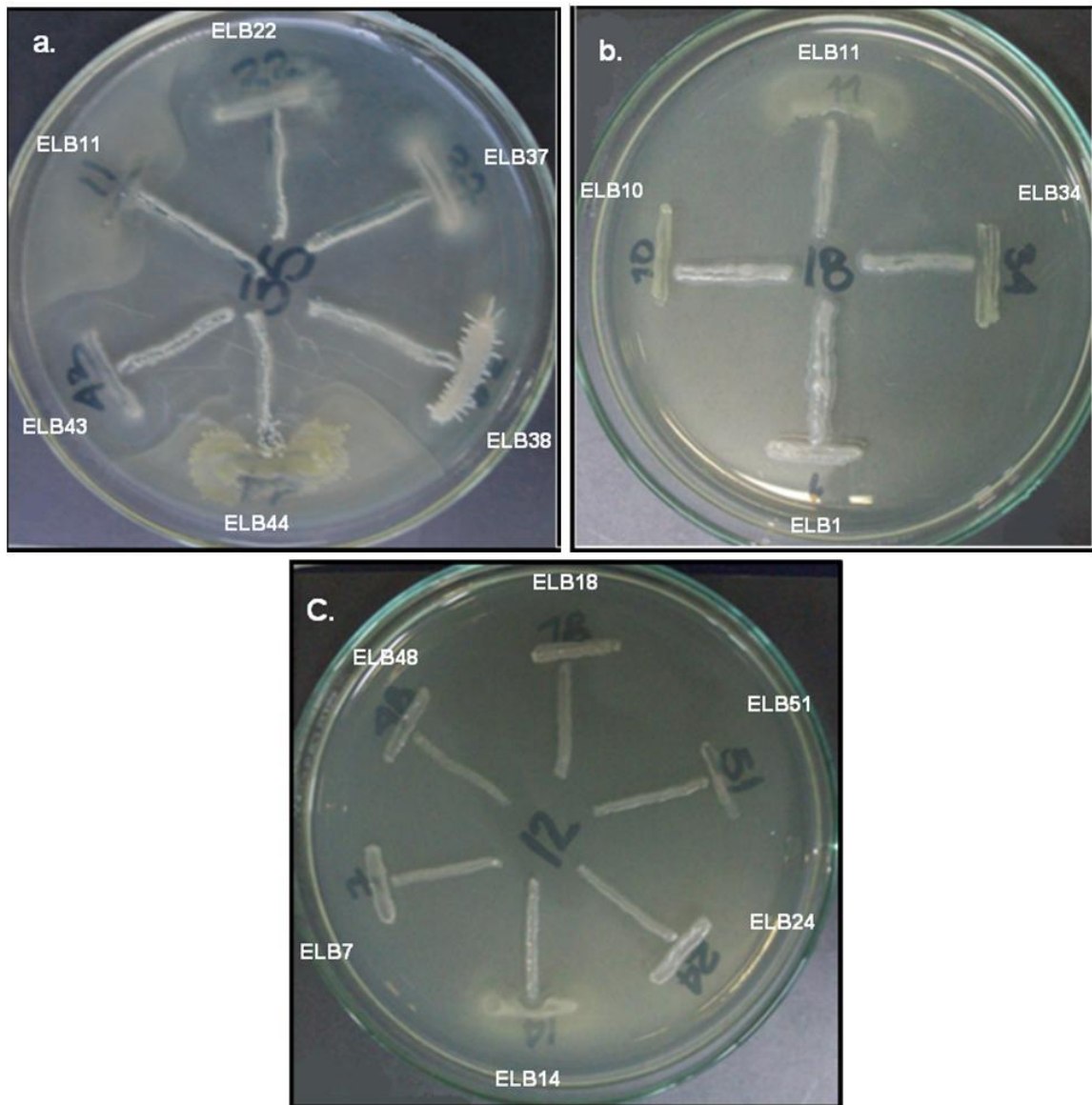


Figura 4-14: Prueba de antagonismo para algunos aislamientos bacterianos de la comunidad cultivada en LB, pertenecientes a la superficie del octocoral *Eunicea* sp., Estas imágenes corresponden a las cajas de Petri en las que se realizó la prueba de antagonismo. a. Enfrentamiento entre el aislamiento ELB35 y los aislamientos ELB11, ELB43, ELB44, ELB38, ELB37 y ELB22. Se evidencia antagonismo entre los aislamientos ELB11 y ELB22, entre el ELB11, ELB44 y el ELB43 y entre el ELB44 y el ELB38. b. Enfrentamiento entre el aislamiento ELB18 y los aislamientos ELB1, ELB10, ELB11 y ELB34. Se evidencia antagonismo entre el aislamiento ELB11 y el ELB18. c. Enfrentamiento entre el aislamiento ELB12 y los aislamientos ELB14, ELB24, ELB51, ELB18, ELB48 y ELB7. Se evidencia antagonismo entre el aislamiento ELB14 y ELB12.

4.3 Estudio preliminar de extractos obtenidos del aislamiento ELB9, inhibidor de *Quorum Sensing*

4.3.1 Ensayos de crecimiento de uno de los aislamientos activos en medios de cultivo diluidos

Con el fin de estudiar de forma preliminar los extractos que se obtendrían de la cepa ELB9, escogida por ser uno de los aislamientos que presenta una actividad inhibidora de QS más marcada, como se puede ver en la tabla 4-2. Se hicieron ensayos de crecimiento probando caldos de cultivo de LB diluidos 5 y 10 veces como medio de cultivo del aislamiento ELB9. En la figura 4-15 se observan los resultados obtenidos para el crecimiento del aislamiento ELB9 en los caldos de cultivo ensayados. El aislamiento ELB9 crece en los dos medios de LB diluidos, aunque este crecimiento es menor al obtenido en el medio empleado normalmente sin diluir. Las tres curvas muestran la misma tendencia, pues se observa que el inicio de la fase logarítmica está entre las 6 y las 10 horas de incubación y el final de ésta fase se encuentra entre las 20 y las 22 horas de incubación para los tres casos.

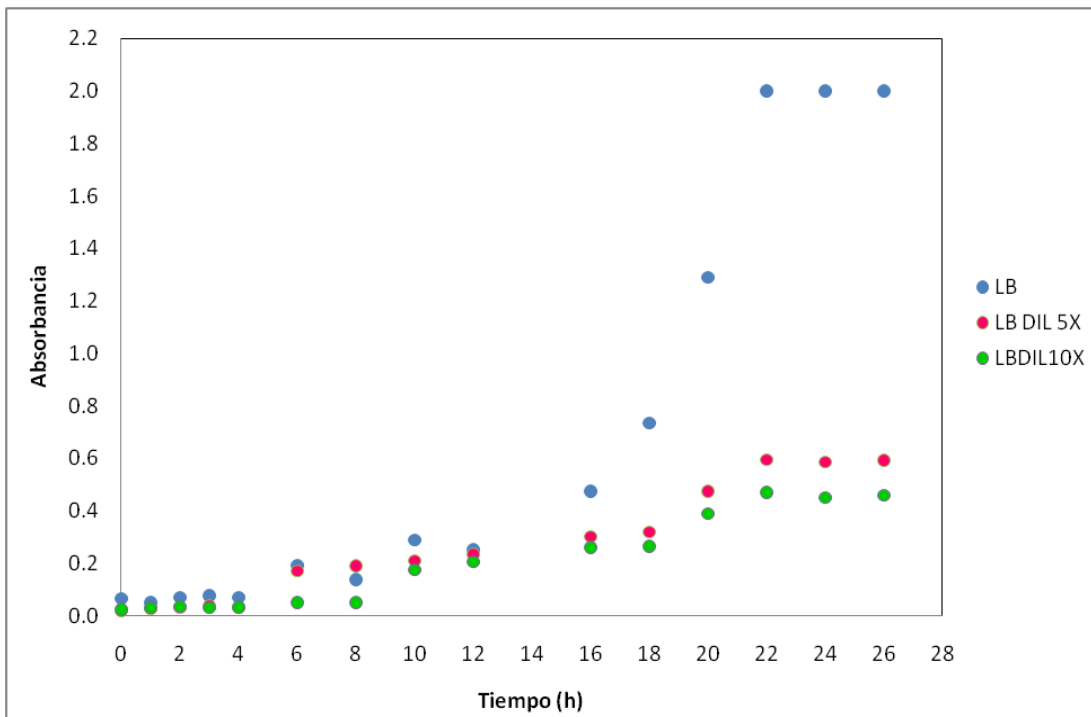


Figura 4-15: Curvas de variación del crecimiento del aislamiento ELB9, medido en densidad óptica a 600 nm, en el tiempo. Empleando como condiciones de crecimiento

incubación a 26-28°C, con agitación, por 24 horas. Los puntos azules hacen referencia al ensayo utilizando como medio de cultivo LB sin diluir, los puntos rosados LB diluido 5 veces y los puntos verdes LB diluido 10 veces.

Debido a que en el ensayo hecho para probar si había crecimiento del aislamiento 9 en los medios diluidos 5 y 10 veces se observó que efectivamente el aislamiento crecía (figura 4-15), se llevaron a cabo extracciones con solventes de diferente polaridad del sobrenadante del caldo de cultivo del aislamiento ELB9 en medio LB diluido 10 veces con una $OD_{600} = 0.5$, los extractos obtenidos se sometieron a ensayos de inhibición de QS para tratar de encontrar la fracción mayoritaria en la que se encuentra el compuesto responsable de esta actividad. Se encontraron resultados positivos para una cantidad del extracto en diclorometano y para los extractos liofilizados del medio acuoso.

4.3.2 Ensayos de inhibición de QS con los extractos obtenidos de la extracción por polaridad del sobrenadante del aislamiento ELB9.

Para los ensayos de inhibición de QS hechos a los extractos obtenidos del sobrenadante del medio de cultivo del aislamiento ELB9, se hicieron pruebas de inhibición de QS usando como biosensor la bacteria *C. violaceum* ATCC 3152 y 600, 400 y 200 ug de los extractos obtenidos con hexano, diclorometano, acetato de etilo, butanol y lo resultante del medio acuoso liofilizado, para cada una de estas pruebas se hicieron blancos del solvente empleado para diluir el extracto a las concentraciones probadas. Se encontraron halos de inhibición de la violaceína para 600 ug del extracto obtenido con diclorometano y para 600, 400 y 200 ug de los extractos acuosos, lo que demuestra que los compuestos responsables de esta actividad son afines a solventes polares. Los resultados encontrados para este ensayo se muestran en la figura 4-16.

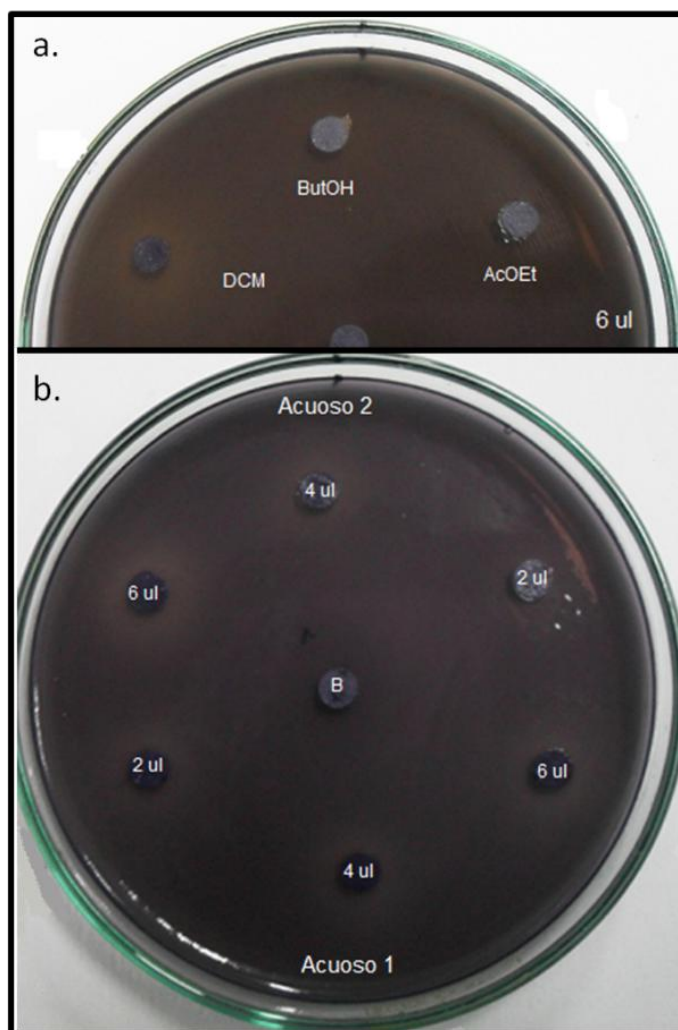


Figura 4-16: Prueba de inhibición de QS para los extractos con actividad del sobrenadante del medio de cultivo del aislamiento ELB9, ensayo hecho utilizando como bacteria biosensora *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. a. Prueba de inhibición de QS para 600 ug de los extractos obtenidos en diclorometano (DCM), butanol (ButOH) y acetato de etilo (AcOET), se evidencia un halo de inhibición de la violaceína alrededor del sensidisco impregnado con diclorometano. b. Prueba de inhibición de QS para 200, 400 y 600 ug de los extractos acuosos 1 y dos, se observan halos de inhibición de la violaceína para los seis sensidiscos mostrados en esta imagen. B hace referencia al blanco, para ello se impregno el sensidisco con 8 ul de dimetilsulfoxido, el cual se utilizó como solvente para los extractos ensayados.

5. Discusión

5.1 Estructura y composición de la comunidad bacteriana asociada con los octocolares *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae*

El análisis de la hibridización fluorescente *in situ*, fue realizado únicamente con el octocoral *P. elisabethae* debido a la autofluorescencia de las muestras del octocoral *Eunicea* sp. Según diferentes reportes, la autofluorescencia ha sido una de las mayores limitaciones en la aplicación de FISH a estudios de corales, ya que los tejidos de estos organismos contienen pociloporinas (moléculas parecidas a la proteína verde fluorescente), estas proteínas han sido encontradas en corales del género *Pocillopora*, *Acropora*, *Porites* y *Plesiastrea*, entre otros (Dove *et al.* 2001), también se han encontrado proteínas rojas fluorescentes en corales, como por ejemplo la proteína Kusabira-Orange del coral *Fungia concinna* (Karasawa *et al.* 2004). Además, se han extraído proteínas rojas fluorescentes fotoactivables que sufren una conversión irreversible de verde a rojo bajo luz azul o UV, ejemplos de éstas son la proteína Kaede del coral *Trachyphyllia geoffroyi* y la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) del octocoral *Dendronephthya* sp., (Piatkevich *et al.* 2010). La autofluorescencia de los corales también puede ser debida a una alta densidad de dinoflagelados endosimbiontes que contienen clorofila entre otras moléculas autofluorescentes (Ainsworth *et al.* 2006). Los ensayos de FISH que dieron resultado en este trabajo se realizaron sobre la muestra del octocoral *P. elisabethae* obtenida del material que se encontraba suspendido en el medio de embalsamamiento, el cual contenía un fragmento entero del coral. Ya que la muestra fijada del octocoral *Eunicea* sp., provenía del macerado de un fragmento, no fue posible hacer lo mismo que con *P. elisabethae* y la autofluorescencia no pudo eliminarse con ninguno de los filtros o tratamientos utilizados, como se observa en la figura 4-2 y 4-4. Los resultados reportados de la composición bacteriana de *Eunicea* sp., fueron obtenidos mediante pirosecuenciación.

Las imágenes de las hibridaciones obtenidas para *P. elisabethae* muestran diferencias entre las sondas para detectar Eubacteria, Gamma-proteobacteria, Beta-proteobacteria y Alfa-proteobacteria. Las bacterias más abundantes pertenecen a la clase Gamma-proteobacteria (figura B-1), seguidas por un 33% de Alfa-proteobacteria (figura B-2) y las que se encuentran en menor abundancia son las Beta-proteobacteria (figura B-3), es importante mencionar aquí que la variabilidad de los conteos realizados para Beta-proteobacteria fue muy alta (ver figura 4-5), debido posiblemente al bajo número de bacterias representantes de esta clase y al marcador fluorescente de la sonda. La sonda con la que contamos está marcada con un fluorocromo que emite a una longitud de onda de 554 nm (amarillo) y en las condiciones metodológicas de este trabajo no era posible distinguirla de la señal de Eubacteria, cuya sonda está marcada con un fluorocromo que emite en 519 nm (verde), ya que las longitudes de onda de estas dos sondas son tan cercanas no fue posible hacer hibridaciones empleándolas simultáneamente, como se hizo para cuantificar los otros grupos bacterianos, por lo que el porcentaje de bacterias correspondiente a Beta-proteobacterias debió hacerse cuantificando imágenes de hibridaciones con cada una de estas sondas por separado. Para futuros ensayos se recomienda marcar una sonda para Eubacteria con un fluorocromo que emita en la longitud de onda correspondiente al rojo, como por ejemplo Alexa594. Aunque, la muestra tomada para *P. elisabethae* (material suspendido en el sobrenadante) no incluye a las bacterias que se mantienen adheridas a la superficie después de los tratamientos, la abundancia de las clases Alfa, Beta y Gamma-proteobacteria son representativas y coinciden con estudios realizados previamente por el grupo de investigación “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia” con otras técnicas independientes de cultivo.

Existen algunos estudios de la composición de la microbiota bacteriana en tres especies de octocorales *Icilogorgia schrammi*, *Leptogorgia minimata* y *Swiftia exertia* utilizando FISH, en los que se reporta que las clases más abundantes fueron Alfa-proteobacteria, Gamma-proteobacteria y Beta-proteobacteria. En los octocorales *I. schrammi* y *S. exertia* la clase más abundante es Alfa-proteobacteria con el 18% y el 26% respectivamente, seguido por Gamma-proteobacteria con el 9% y el 20% respectivamente; mientras que en el octocoral *L. minimata* la clase más abundante fue Gamma-proteobacteria con un 33%, seguido por Alfa-proteobacteria con un 18% (Brück *et al.* 2007) es importante

resaltar que la clase Beta-proteobacteria fue la menos abundante, dentro de las tres mayores clases de proteobacterias, al igual que en el octocoral *P. elisabethae* estudiado en este trabajo mediante FISH.

Según los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación, la comunidad bacteriana de *Eunicea* sp., tiene una estructura diferente a la de *P. elisabethae* pero coinciden en la abundancia de Gamma-proteobacteria, que como se verá más adelante, es el caso de varios organismos marinos. Se encontró que aproximadamente un 70% de las bacterias en *Eunicea* sp., pertenecen al phylum proteobacteria, dentro de éste aproximadamente un 46% pertenecen a la clase Gamma-proteobacteria (figura 4-9) y un 17% a la clase Beta-proteobacteria, la clase Alfa-proteobacteria se encuentra en un 3% aproximadamente. Estos resultados se ven reflejados en la identificación de los 13 aislamientos que se han caracterizado hasta el momento, pues los géneros más abundantes pertenecen a Gamma-proteobacteria: *Vibrio* y *Stenotrophomonas*.

En trabajos previos, se ha demostrado que tanto en corales blandos (octocorales) como en corales duros, las poblaciones bacterianas dominantes son aquellas pertenecientes al phylum Proteobacteria, y en proporciones menores se encuentran poblaciones de Firmicutes y Actinobacteria (Brück *et al.* 2007; Penn *et al.* 2006; Harder *et al.* 2003). Lampert *et al.* (2008), empleando diferentes técnicas para la caracterización de la diversidad filogenética asociada con el moco de corales rojos encontraron que la mayoría de bacterias asociadas eran proteobacterias y entre éstas, el mayor porcentaje lo tienen la clase Gamma-proteobacteria con un 27% (Lampert *et al.* 2008). En otro estudio, utilizando una librería de clonación del gen 16S de bacterias asociadas con corales del género *Acropora*, encontraron que la clase Gamma-proteobacteria era la más abundante junto con Alfa-proteobacteria (Littman *et al.* 2009). Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado en las comunidades bacterianas asociadas con los octocorales *Eunicea* sp., y *P. elisabethae*, en los que por medio de diferentes técnicas *in situ* independientes de cultivo se caracterizaron sus comunidades y se encontró que la clase más abundante es Gamma-proteobacteria.

Mediante pirosecuenciación fue posible determinar que los géneros más abundantes dentro de la comunidad bacteriana asociada con el octocoral *Eunicea* sp., son *Stenotrophomonas*, *Serratia* y *Pseudomonas* (figura B-1). Sobre estos géneros bacterianos se ha encontrado que algunas especies de *Pseudomonas* como *P.*

synxantha y *P. falgida* aisladas de la superficie del octocoral *Sarcophyton* sp., inhiben la formación de *biofouling* (Sabdon & Radjasa 2006). También hay reportes de metabolitos con actividad *antifouling* extraídos de *Pseudomonas* sp., aislada de un nudibranquio (Burgess *et al.* 2003). Esta misma actividad se le ha atribuido a algunas especies del género *Pseudoalteromonas*, este es el caso del alga verde *U. lactuca* en la que bajas densidades poblacionales de *Pseudoalteromonas tunicata* inhiben el asentamiento de otros organismos sobre su superficie (Egan *et al.* 2000). En este trabajo se encontró que sólo un 0.2% de las secuencias obtenidas para Gamma-proteobacteria pertenecían al orden *Alteromonadales*, en el cual se clasifican las bacterias del género *Pseudoalteromonas*, dado el impacto ecológico que tiene la presencia de este tipo de bacterias en las superficies de sus hospederos, se realizó la búsqueda del complejo *Antifouling* reportado por Skovhus y colaboradores en 2007 entre la comunidad bacteriana de *Eunicea* sp. Este complejo está conformado por las especies bacterianas *Pseudoalteromonas tunicata* y *Pseudoalteromonas ulvae*, fue llamado así por Skovhus y colaboradores (2007), pues estas dos especies bacterianas producen compuestos extracelulares que inhiben el crecimiento y la colonización de diferentes organismos marinos y se han encontrado formando parte de las biopelículas de organismos marinos libres de *fouling* como *Ulva lactuca*, *Ulvaria fusca* y *Ciona intestinalis*. Para su detección se utilizaron los *primers* específicos para *Pseudoalteromonas tunicata* y *Pseudoalteromonas ulvae*, reportados por (Skovhus *et al.* 2007), sin embargo no se obtuvieron amplificables detectables en el gel de electroforesis (figura 4-11). Teniendo en cuenta que solo el 0.2% de las secuencias obtenidas para Gamma-proteobacteria pertenecían al orden *Alteromonadales*, al que pertenece el género *Pseudoalteromonas*, es posible que estas bacterias se encuentren en un número menor al detectable con esta técnica, el cual según Zoetendal y colaboradores (2001) está entre 5×10^2 y 5×10^3 células (Zoetendal *et al.* 2001), o a que este grupo *antifouling* no está presente en la microbiota del octocoral *Eunicea* sp., y por lo tanto no es el responsable de mantener limpia su superficie, en lo cual podrían estar involucradas otro tipo de bacterias que controlen la estructura de esta comunidad bacteriana, como se observó en nuestro trabajo.

Dentro de las comunidades aislables de *Eunicea* sp., el estudio taxonómico se concentró en la comunidad que presentó la característica de inhibir el *Quorum Sensing* de *Cromobacterium violaceum*. De los trece aislamientos con esta actividad, doce fueron

identificados y se encontraron bacterias pertenecientes a las clases Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria, Bacilli y Actinobacteria. Cinco de estos aislamientos fueron clasificados como *Alcaligenes faecalis* (Beta), cuatro aislamientos pertenecen al género *Vibrio* (Gamma), un aislamiento pertenece a la especie *Stenotrophomonas rhizophila* (Gamma), un aislamiento corresponde con el género *Microbacterium* sp. (Actinobacteria) y uno a la especie *Bacillus fusiformis*. La mayoría de bacterias aisladas de los diferentes medios de cultivo empleados en este trabajo (no solo de la comunidad que inhibió QS) son Gram negativas. Lo anterior está de acuerdo con lo encontrado en otros trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, en los que la mayoría (80%) de bacterias aisladas de muestras marinas son Gram negativas (Castro *et al.* 2008). Según los reportes de estudios de la composición bacteriana de organismos marinos libres de *macrofouling*, se ha visto que las especies más abundantes pertenecen a las clases Gamma, Beta y Alfa-proteobacteria. Para el alga *D. pulchra*, se reportó que la clase bacteriana más abundante era Gamma-proteobacteria (Penesyan *et al.* 2009), mientras que en el alga *U. australis*, fue Alfa-proteobacteria (Burke *et al.* 2011). En otro trabajo sobre el octocoral limpio *Dendrophthya* sp., se encontró que la comunidad bacteriana estaba constituida principalmente por Gamma-proteobacteria y en menor proporción por Alfa-proteobacteria (Harder *et al.* 2003).

Es importante mencionar que los resultados obtenidos con métodos dependientes de cultivo, concuerdan en algunos casos, con los encontrados por pirosecuenciación que es una técnica independiente de cultivo; porque se observó que las clases Gamma y Beta-proteobacteria son las más abundantes presentes en el octocoral *Eunicea* sp., y dentro de la clase Gamma-proteobacteria se encontró que uno de los géneros más abundantes era *Stenotrophomonas*, género del cual se aisló una de las cepas identificadas. Los resultados mostrados previamente y los encontrados por otros investigadores, por medio de técnicas dependientes e independientes de cultivo, sugieren que las clases Alfa, Beta y Gamma proteobacteria juegan un papel fundamental en las superficies de los organismos libres de *biofouling*, siendo la clase Gamma-proteobacteria una de las más abundantes en estos ejemplares.

5.2 Inhibición de *Quorum Sensing* y antagonismo dentro de la comunidad bacteriana asociada con el coral limpio *Eunicea* sp.

En las pruebas de inhibición de QS hechas a las comunidades aisladas del octocoral *Eunicea* sp., se encontró que la comunidad aislada en el medio LB y, de forma independiente, 13 de sus aislamientos tenían actividad inhibidora del QS, esta actividad puede ser vista como un mecanismo empleado por las bacterias asociadas con la superficie de este organismo para ejercer un control ambiental en la comunidad, el cual muy posiblemente contribuya a que la superficie de este octocoral sea limpia.

La capacidad de los octocorales de controlar su micro y *macrofouling* ha sido atribuida a excreciones de limo y a la producción de metabolitos secundarios (Dobretsov 2004). En un trabajo reciente llevado a cabo en la Gran Barrera de Coral, se encontró que el 23% de los extractos, provenientes de 284 organismos sésiles marinos, inhibían el QS. El porcentaje de extractos con actividad inhibidora fue mayor para muestras de octocorales que para muestras de otros organismos marinos (Skindersoe *et al.* 2008). Aunque en este último trabajo fue claro que los octocorales son una fuente importante de sustancias naturales inhibidoras del QS, fue llevado a cabo en muestras de octocorales macerados, por lo tanto no es posible determinar si la actividad de los extractos resultantes proviene de metabolitos del octocoral en sí, o de las bacterias asociadas a éste. En nuestro trabajo, las muestras provenientes del octocoral *Eunicea* sp., fueron procesadas de tal forma que se aislaron las bacterias asociadas con este octocoral, con el propósito de evaluar su actividad inhibidora de QS, encontrando que un 41% de los aislamientos provenientes de la comunidad aislada en el medio LB (que representan el 14 % de los que se aislaron en todos los medios de cultivo) tiene actividad inhibidora de QS, fue posible identificar 12 de los 13 aislamientos activos encontrando que cinco de ellos pertenecen a la especie *Alcaligenes faecalis*, cuatro al género *Vibrio* sp., uno a *Microbacterium* sp., uno a *Stenotrophomonas rhizophila* y uno a *Bacillus fusiformis*. Esta es la primera vez que se realiza un trabajo en el que se evalúa el papel que juega la comunicación bacteriana (QS) en el control de la estructura poblacional de la comunidad asociada con un octocoral libre de *macrofouling*.

Las sustancias inhibidoras de QS (IQS) modifican el comportamiento de una comunidad bacteriana bloqueando la sincronización de algunos fenotipos necesarios para controlar la maduración de las biopelículas, por esta razón, Dobretsov y colaboradores (2009) propusieron que los inhibidores de QS deben tener un efecto indirecto en el asentamiento de larvas a través de la modulación de las propiedades de las biopelículas y posteriormente en la metamorfosis funcional de las mismas (Seipp *et al.* 2007; Dobretsov *et al.* 2009). También se ha visto que no solo los IQS modulan la composición de microorganismos en una biopelícula, la presencia o ausencia de moléculas de señalización también generan un gradiente que atrae o repele a ciertas larvas (Joint *et al.* 2007; Wheeler *et al.* 2006). Esta evidencia ha mostrado que las comunidades bacterianas controlan su composición, su densidad poblacional y la selección de otros organismos que puedan asentarse en un microambiente. Al evitar la conformación y la maduración de biopelículas bacterianas (fenotipo que está regulado por QS) se genera una interferencia con el desarrollo del *biofouling* y este parece ser uno de los mecanismos utilizados por muchos organismos marinos (Rasmussen *et al.* 2000; Kociolek 2009).

Existen varios ejemplos en los que estas interacciones biológicas se reflejan en el control de *biofouling*, *Pseudoalteromonas* sp., inhibe el asentamiento de larvas marinas de algas (Ma *et al.* 2009), *Vibrio* sp., y *Pseudoalteromonas* sp., aislados del alga *Ulva reticulata*, inhiben el crecimiento de *Nitzschia paleacea* y el asentamiento de las larvas de *H. elegans* (Dobretsov & Qian 2002), en un estudio diferente, se encontró que especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* mostraron actividad *antifouling* (Burgess *et al.* 2003). También se ha estudiado el papel que desempeña la composición de las comunidades bacterianas en la conformación del *biofouling*, en el octocoral *Dendronephthya* sp., se encontró que cuatro aislamientos de su superficie inducían el asentamiento de larvas de invertebrados, dos aislamientos lo inhibían (aislamientos correspondientes a las clases Gamma y Alfa-proteobacteria) y otro aislamiento permitía un asentamiento moderado. El experimento se llevó a cabo con una biopelícula multiespecies empleando una relación igual de todos los aislamientos usados, ya que no conocían las abundancias relativas de las bacterias en el octocoral estudiado. Cuando todos los aislamientos fueron mezclados (inductivos, no inductivos e inhibidores) se obtuvo una biopelícula en la cual el asentamiento de larvas era inhibido (Dobretsov 2004). Estos resultados muestran que aún cuando la población de bacterias activas es

menos abundante que otras poblaciones, su efecto es suficiente para controlar la comunidad completa.

En el presente trabajo, encontramos que los aislamientos con actividad inhibidora de QS fueron *Alcaligenes faecalis* (Beta-proteobacteria), *Bacillus fusiformis* (Bacilli), *Microbacterium* sp., (Actinobacteria), *Stenotrophomonas rhizophila* y *Vibrio* sp., (Gamma-proteobacteria). Estos resultados muestran que las bacterias con actividad inhibidora de QS son solo una pequeña parte de la comunidad, pues solo una de las cuatro comunidades aisladas y 13 de los 92 aislamientos totales (el 14%) fueron activos para la inhibición de QS.

Alcaligenes faecalis es una bacteria ubicua que ha sido aislada de muestras marinas, acuáticas, suelo, humanas y de aguas residuales de un bioprocesador (Reh fuss & Urban 2005; Kimura *et al.* 2009). No se han encontrado trabajos de investigación sobre moléculas señal de QS o compuestos inhibidores de QS producidos por *A. faecalis*. Se sabe que esta especie bacteriana sintetiza la acilasa Penicilina G (PGA, por sus siglas en inglés), sin embargo se comprobó después que esta acilasa no sólo hidroliza la penicilina, fue probada con fenilacetanilidas p-sustituidas (Zhiryakova *et al.* 2009a; Zhiryakova *et al.* 2009b) y se encontró que en todos los casos se llevó a cabo la reacción de hidrólisis pero había variaciones en la velocidad dependiendo del sustituyente de las fenilacetanilidas. No hay estudios sobre la actividad hidrolítica de esta enzima en N-acil homoserín lactonas (AHLs), pero dada su estructura existe la posibilidad de que la enzima actúe también como inhibidora del QS, por consiguiente se sugiere probar su actividad contra AHLs para considerarla responsable de esta actividad en *A. faecalis*. Hasta el momento, este trabajo es el primer reporte sobre actividad inhibidora de QS producida por esta bacteria. En los extractos obtenidos del medio de crecimiento de esta cepa se encontraron dos tipos de compuestos que inhiben QS, unos polares que se mantuvieron en la fase acuosa y otros menos polares que se extrajeron con diclorometano. Como se observa en la figura 4-16, la mayor cantidad ensayada del extracto obtenido en diclorometano (600 ug) tuvo actividad IQS, mientras que en los extractos obtenidos del medio acuoso se encontró que tienen actividad inhibidora de QS en todas las cantidades ensayadas, esta última es una evidencia más para sugerir que la enzima reportada pueda ser responsable en parte de actividad IQS o que podría existir

una hidrolasa específica con esta función, ya que las proteínas suelen extraerse y mantenerse funcionales en la fase acuosa.

Vibrio sp., también ha sido aislada de muestras marinas y se ha encontrado que este género hace parte de las bacterias que primero colonizan una superficie inerte de phytigel sumergida en el mar (Mora-Cristancho *et al.* 2011). Aunque no hay reportes en la literatura sobre actividad inhibidora de QS en este género, Dobrestsov y colaboradores (2004) encontraron que *Vibrio* sp., sintetiza un compuesto *antifouling*, este compuesto es un polisacárido de peso molecular mayor a 100 KDa. Los investigadores sugieren que este polisacárido de *Vibrio* sp., se une a los receptores de lectina de las larvas, evitando su unión y por consiguiente el asentamiento (Dobrestsov 2004). Teniendo en cuenta todo lo anterior, este sería el primer trabajo que relaciona la actividad inhibidora de QS del género *Vibrio* sp., con una superficie libre de *macrofouling*.

Bacillus fusiformis ha sido aislado de muestras marinas, de suelo, plantas y humanos (Nakamura 2000). Aunque no hay reportes en la literatura sobre compuestos inhibidores de QS de esta especie bacteriana específicamente, se sabe que las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* sintetizan lactonas. Como por ejemplo. *B. cereus*, *B. mycoidetes* y *B. thuringiensis* los cuales produce la enzima AiiA, esta enzima es específica para la degradación de acil homoserina lactonas y actúa catalizando la reacción de apertura del anillo de las AHLs. Se ha visto que en 2 horas, hasta 20mM de N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserín lactona (3-oxo-C6-HSL) puede ser completamente inactivada en el caldo de cultivo en el que la enzima es producida (Rasmussen & Givskov 2006a; Barczak & Hung 2009; Geske *et al.* 2008; Suga & Smith 2003).

La asociación entre ciertas especies de corales y especies específicas de bacterias, muestra que debe haber un vínculo muy cercano entre las comunidades que se asocian y el hospedero (Knowlton & Rohwer 2003), se ha sugerido que el papel que desempeñan las bacterias asociadas a los corales es proteger sus superficies, por medio de la producción de antibióticos, la colonización del espacio disponible evitando el desarrollo de enfermedades, y compitiendo con bacterias externas al coral (Ritchie 2006). Además se sabe que las bacterias asociadas con una superficie no solo regulan la expresión coordinada de fenotipos, sino que están sometidas a gradientes de sustancias antimicrobianas y sustancias específicas que les permiten antagonizar entre ellas regulando su propio crecimiento. Por ejemplo el 35% de más de 400 cepas aisladas de la

superficie de algas e invertebrados de Escocia, mostraron actividad antimicrobiana (Burgess *et al.* 1999). En este trabajo nosotros también encontramos este tipo de actividad antagonista, 14 aislamientos fueron enfrentados contra 32 aislamientos, todos ellos provenientes de la comunidad aislada en el medio de cultivo LB del octocoral *Eunicea* sp., se observó que de estos 14 aislamientos más de la mitad tienen actividad antagónica de crecimiento y entre estas cepas las que más antagonismo presentaron fueron los aislamientos ELB9 y ELB11 que corresponden a *A. faecalis* y *B. fusiformis*. Estos aislamientos también son capaces de inhibir el QS de *C. violaceum*. Estas relaciones antagónicas entre bacterias que ocupan un mismo espacio pueden estar influenciando la diversidad de la comunidad y a su vez la estructura de poblaciones que ocupan una misma área.

Todas estas son evidencias importantes que permiten sugerir que las comunidades bacterianas de la microbiota natural de un organismo desempeñan funciones de control para la regulación del crecimiento y la coordinación de fenotipos que permitan establecer un equilibrio en el holobionte. En el caso de los organismos como *Eunicea* sp., este control se refleja en que las superficies del octocoral se mantienen libres de *macrofouling* y unas de las razones pueden ser la inhibición de la comunicación celular que conlleva a una biopelícula inmadura y el antagonismo entre estas bacterias que controla el crecimiento exagerado de algunas poblaciones

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

Con los estudios realizados en este trabajo pudimos determinar que la estructura de las comunidades asociadas con los octocorales *Eunicea* sp., y *P. elisabethae* son diferentes en la abundancia relativa de las clases de Proteobacteria que las componen, sin embargo los dos octocorales comparten la misma proporción de especies pertenecientes a la clase Gamma-proteobacteria. En el octocoral *Eunicea* sp., las abundancias relativas de las clases de Proteobacteria fueron consistentes con los géneros más abundantes encontrados por pirosecuenciación y con los aislamientos caracterizados con métodos dependientes de cultivo.

La inhibición del *Quorum Sensing* es un mecanismo común entre los organismos marinos para ejercer un control ambiental que contribuya a mantener su superficie libre de *fouling*. En este estudio fue posible comprobar que la actividad inhibidora de *Quorum Sensing* está presente en la comunidad bacteriana asociada con el octocoral *Eunicea* sp., y se caracterizaron los aislamientos bacterianos responsables de dicha inhibición. Esta es una evidencia única sobre el papel que juega la comunicación bacteriana en el control de la estructura poblacional de una comunidad.

Dentro de este estudio se encontraron relaciones antagónicas entre bacterias que ocupan un mismo espacio lo cual influye la diversidad de la comunidad y a su vez la estructura de poblaciones que ocupan una misma área.

Las relaciones ecológicas entre las poblaciones que conforman la comunidad del octocoral *Eunicea* sp., estudiadas en este trabajo, revelan el control de la regulación del crecimiento y la coordinación de fenotipos, esta organización permite definir el espacio que ocupan las diferentes poblaciones bacterianas dentro de la comunidad. Este control

probablemente determina que las superficies del octocoral se mantengan libres de *macrofouling*.

6.2 Recomendaciones

- Debido a los inconvenientes encontrados en la cuantificación de bacterias de la clase Beta-proteobacteria, asociadas con el octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, se recomienda la consecución de una sonda, para esta clase bacteriana o para Eubacteria, marcada con un fluorocromo que emita en la longitud de onda roja.
- Ya que en este estudio se encontró dentro de los aislamientos con actividad inhibidora de QS, una bacteria identificada como *Alcaligenes faecalis* y dentro de la revisión bibliográfica se encontró que ésta produce la acilasa penicilina G, enzima que también podría ser responsable de la degradación de la molécula señal de *C. violaceum* (biosensor contra el que se probó su actividad inhibidora de QS). Se recomienda hacer ensayos con la acilasa penicilina G de *A. faecalis* sobre acilhomoserín lactonas, para determinar si ésta enzima es la responsable de la actividad inhibidora de QS mostrada por esta bacteria.
- En este trabajo, se obtuvieron extractos por polaridad del medio de cultivo diluido de un aislamiento identificado como *A. faecalis* (inhibidor de QS), de estos extractos se encontró actividad inhibidora de QS en dos de ellos, por lo que se recomienda emplear técnicas de separación sobre éstos para hacer posible la identificación de las sustancias puras responsables de ésta actividad.
- En el presente estudio se encontraron aislamientos pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Microbacterium* y a la especie *Stenotrophomonas rhizophila*, las cuales inhibieron el QS cuando se enfrentaron al biosensor *C. violaceum*, ya que dicha actividad no se ha reportado para especies de estos géneros, se sugiere continuar trabajando con estos aislamientos con el fin de encontrar los compuestos responsables de esta actividad.

A. Anexo: Imágenes obtenidas para FISH en *P. elisabethae*

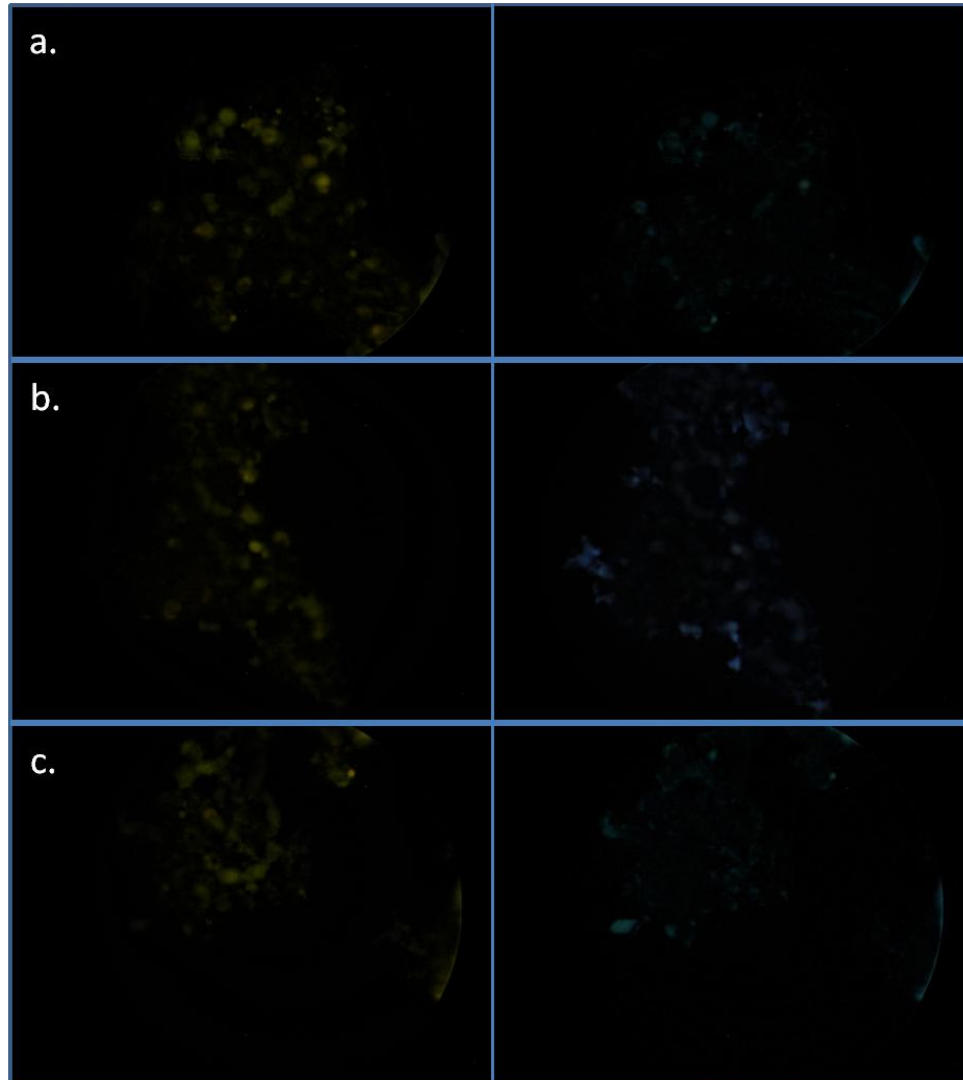


Figura A-1: Muestra de imágenes obtenidas para FISH con sondas para Eubacteria y Alfa-proteobacteria. Para detectar eubacterias, sonda EUB338 con el fluorocromo Alexa488, (imágenes mostradas al lado izquierdo) y para detectar alfaproteobacterias, sonda ALF443 con el fluorocromo Cascade Blue® (imágenes mostradas al lado derecho). Las hibridaciones fueron hechas simultáneamente con las dos sondas nombradas anteriormente y las imágenes fueron obtenidas utilizando el filtro apropiado para detectar cada sonda. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio Zeiss® Axiophot, con un abjetivo de aumento de 100X Plan Neo-fluor Zeiss®, empleando el

juego filtros F2 y a 1/2" de exposición. En todos los casos las imágenes fueron analizadas y sobrepuestas con la ayuda del programa Image J.

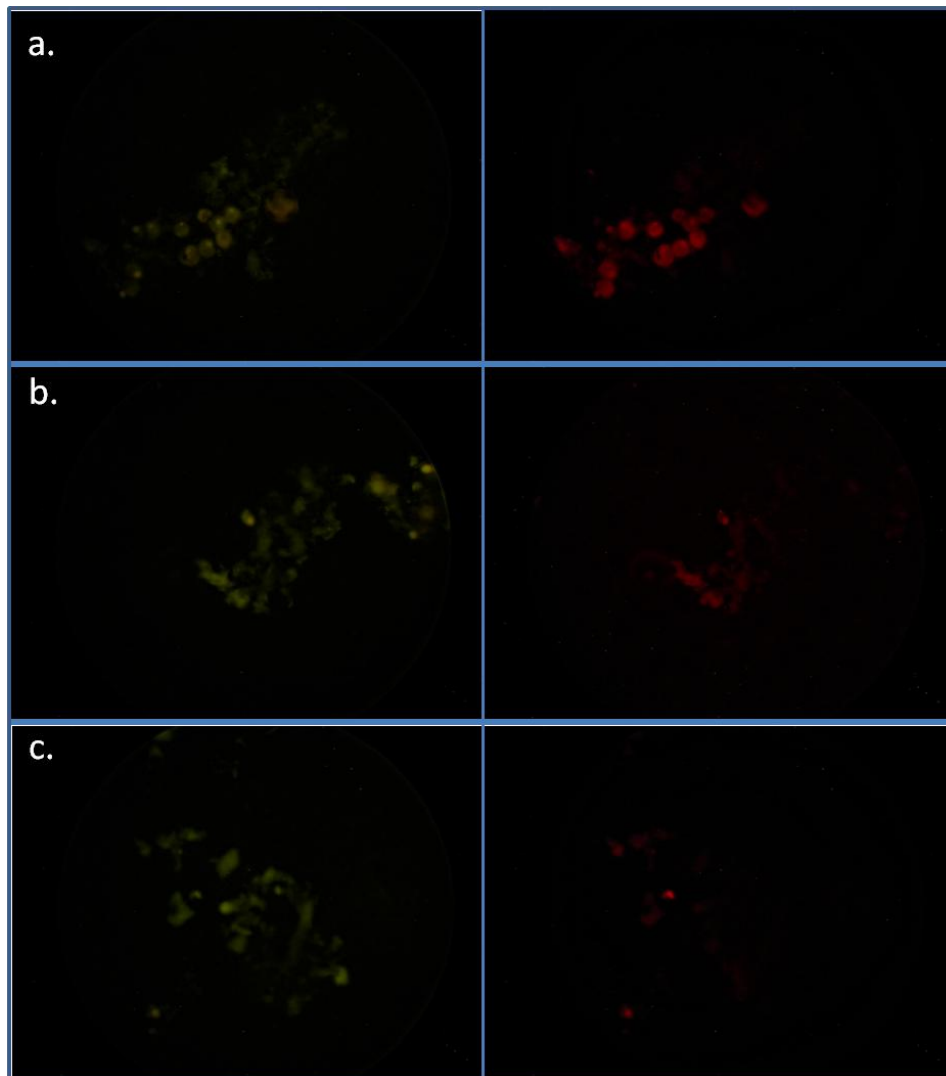


Figura A-2: Muestra de imágenes obtenidas para FISH con sondas para Eubacteria y Gamma-proteobacteria. Para detectar eubacterias, sonda EUB338 con el fluorocromo Alexa488, (imágenes mostradas al lado izquierdo) y para detectar gammaproteobacterias, sonda GAM42a con el fluorocromo Alexa 594 (imágenes mostradas al lado derecho). Las hibridizaciones fueron hechas simultáneamente con las dos sondas nombradas anteriormente y las imágenes fueron obtenidas utilizando el filtro apropiado para detectar cada sonda. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio Zeiss® Axiophot, con un abjetivo de aumento de 100X Plan Neo-fluor

Zeiss®, empleando el juego filtros F2 y a 1/2" de exposición. En todos los casos las imágenes fueron analizadas y sobrepuestas con la ayuda del programa Image J.

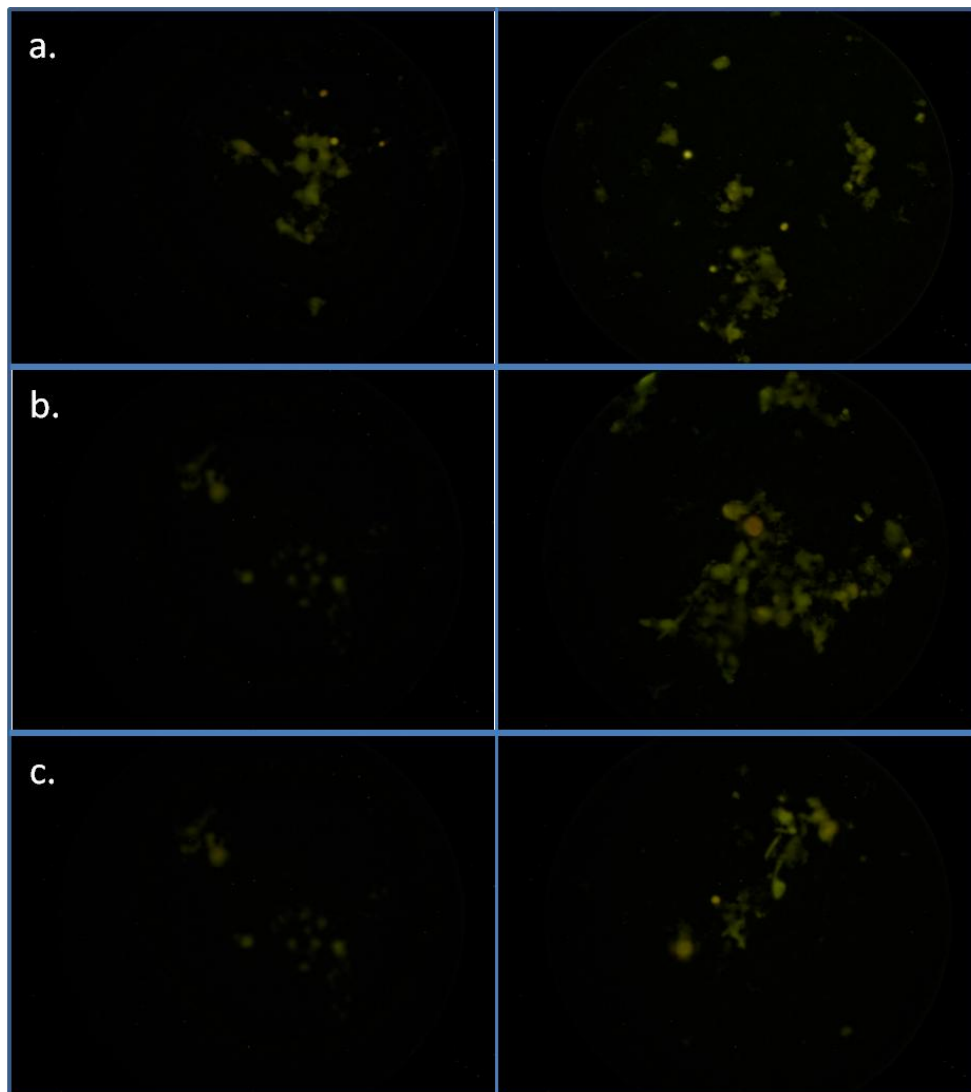


Figura A-3: Muestra de imágenes obtenidas para FISH con sondas para Eubacteria y Beta-proteobacteria. Para detectar eubacterias, sonda EUB338 con el fluorocromo Alexa488, (imágenes mostradas al lado izquierdo) y para detectar betaproteobacterias, sonda BET42a con el fluorocromo Alexa 532 (imágenes mostradas al lado derecho). Las hibridaciones fueron hechas simultáneamente con las dos sondas nombradas anteriormente y las imágenes fueron obtenidas utilizando el filtro apropiado para detectar cada sonda. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio Zeiss® Axiophot, con un abjetivo de aumento de 100X Plan Neo-fluor Zeiss®, empleando el juego filtros F2 y a 1/2" de exposición. En todos los casos las imágenes fueron analizadas y sobrepuestas con la ayuda del programa Image J.

Tabla A-1: Conteos de pixeles para las sondas hibridizadas mediante FISH para la muestra del material suspendido en el medio de embalsamamiento del octocoral *P. elisabethae*.

Imagen	Alfa	Eubacteria	% Alfa	Gamma	Eubacteria	% Gamma	Beta	Eubacteria
1	28250	78617	36	18848	42648	44	1583	3775
2	28149	81422	35	20236	43731	46	1371	3816
3	29771	85612	35	14342	36905	39	1446	3971
4	28465	80255	35	15036	36741	41	1227	14417
5	21982	71691	31	13686	35432	39	1224	8809
6	23358	65649	36	13019	33527	39	1967	9222
7	15935	49121	32	23741	56177	42	1586	12800
8	16120	48114	34	22126	54403	41	1467	14249
9	9122	29572	31	14921	32194	46	1565	16189
10	9276	29572	31	15421	33865	46	1339	5844
Promedio			34			42	1477	9309
Desvest			2			3	218	4849
% Beta								16
Desvest								9

Imágenes analizadas con el programa Image J.

B. Anexo: Abundancia relativa de las clases Alfa, Beta y Gamma-proteobacteria asociadas con el octocoral *Eunicea* sp.

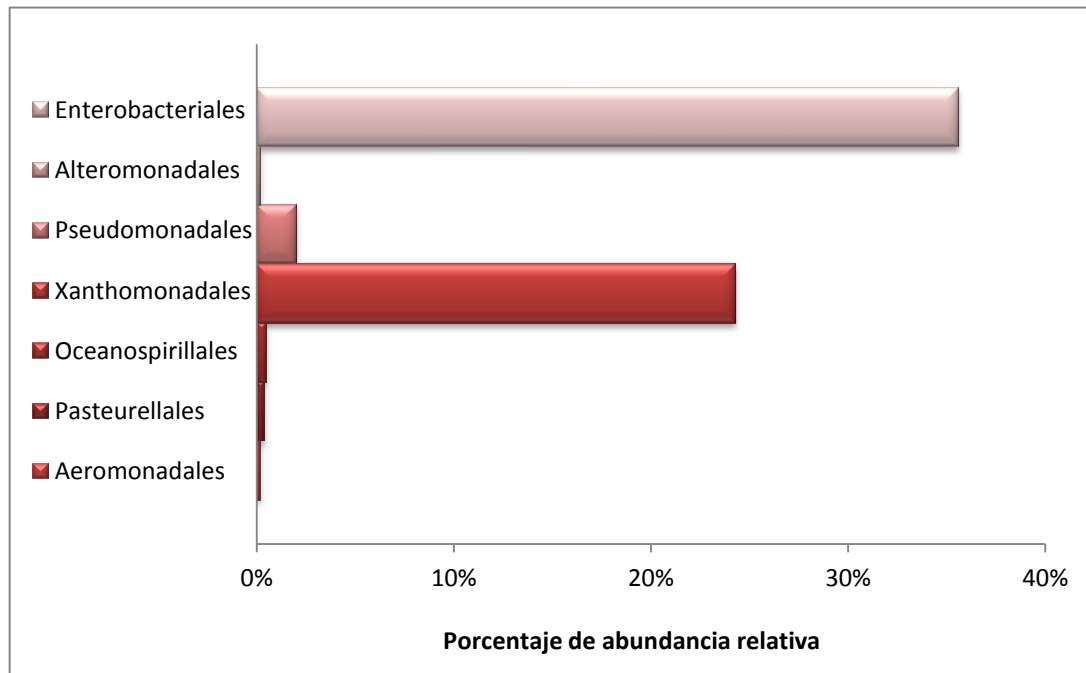


Figura B-1: Abundancia relativa de la clase Gamma-proteobacteria asociadas con el octocoral *Eunicea* sp. Asignación taxonómica hecha con la herramienta classifier del Ribosomal Database Project (98% de confianza. La asignación de OTUs fue realizada con Dotur)

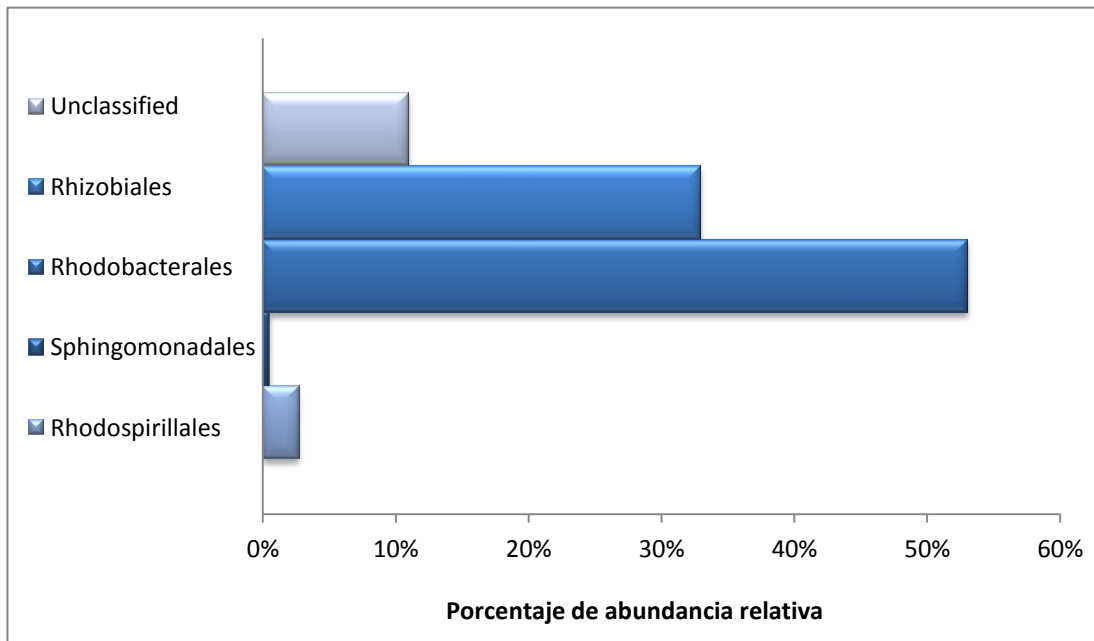


Figura B-2: Abundancia relativa de la clase Alfa-proteobacterias asociadas con el octocoral *Eunicea* sp. Asignación taxonómica hecha con la herramienta classifier del Ribosomal Database Project (98% de confianza. La asignación de OTUs fue realizada con Dotur)

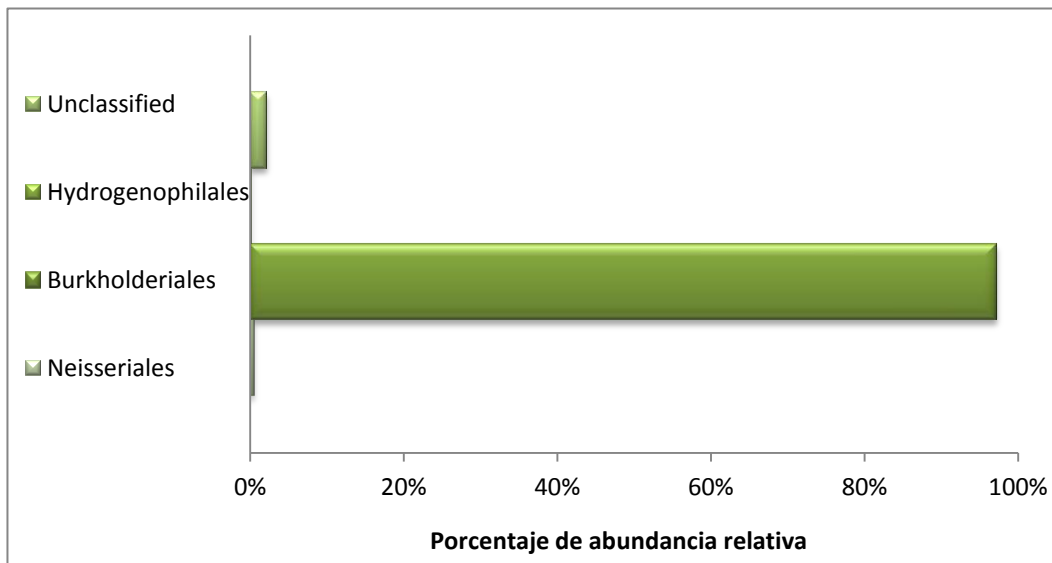


Figura B-3: Abundancia relativa de la clase Beta-proteobacterias asociadas con el octocoral *Eunicea* sp. Asignación taxonómica hecha con la herramienta classifier del Ribosomal Database Project (98% de confianza. La asignación de OTUs fue realizada con Dotur)

C. Anexo: Caracterización bioquímica y por secuenciación del gen 16S rARN de algunos aislamientos.

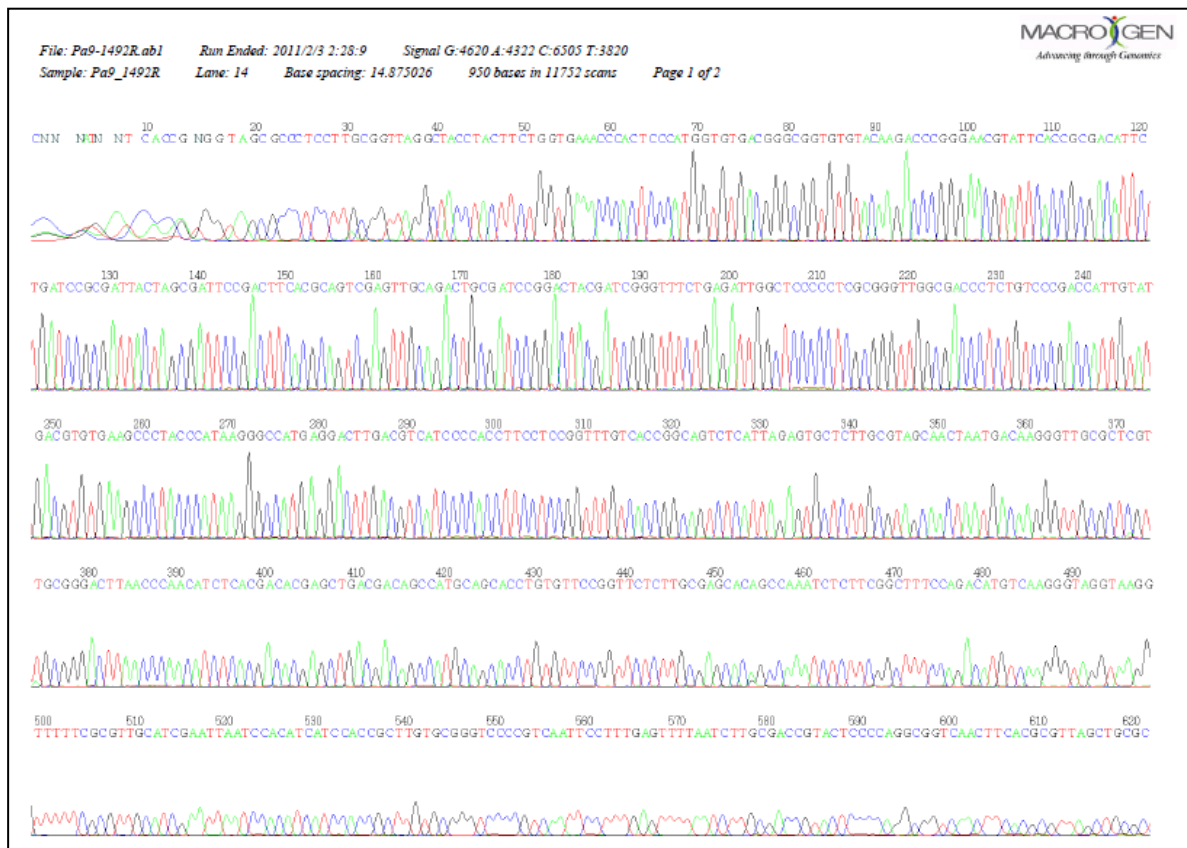


Figura C-1: Muestra de un fluorograma obtenido para una parte de la secuenciación del gen ribosomal 16S para uno de los aislamientos. Llevado a cabo en MacroGen®. En esta imagen se evidencia la calidad de unas de las secuencias obtenidas, pues no se observan solapamientos de picos de fluorescencia, lo cual confirma que el aislamiento secuenciado esta puro.

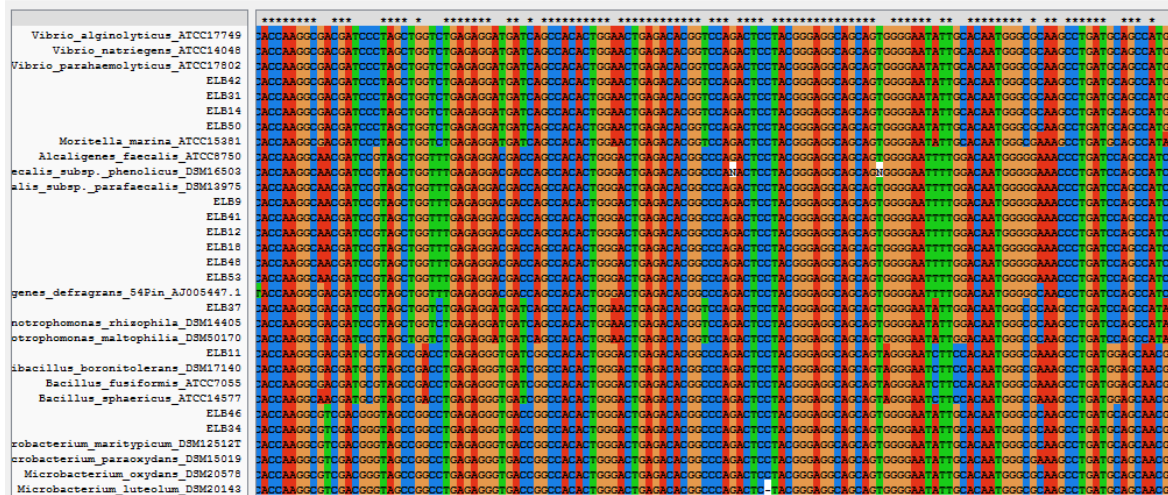


Figura C-2: Muestra de un alineamiento hecho en el programa ClustalX, empleando para construir el dendrograma mostrado en la figura 4-10. secuencias obtenidas para los 14 aislamientos secuenciados, obtenidos del aislamiento en medio de cultivo LB de una muestra del macerado del octocoral *Eunicea* sp.

Tabla C-1: Información sobre las secuencias empleadas para la construcción del dendograma mostrado en la figura 4-10.

Aislamiento	Secuencias del gen ribosomal 16S con % de similitud > 98	Código de acceso al GenBank	Longitud de la secuencia	Colección a la que pertenece
ELB9, ELB12, ELB18, ELB48 y ELB53	<i>Alcaligenes faecalis</i>	D88008.1	1470 bp	ATCC
	<i>Alcaligenes faecalis subsp. parafaecalis</i>	AJ242986.1	1414 bp	DSM
	<i>Alcaligenes faecalis subsp. phenolicus</i>	AY296718.1	1503 bp	DSM
	<i>Alcaligenes defragrans</i>	AJ005447.1	1484 bp	DSM
ELB11	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	AF169537.1	1412 bp	ATCC
	<i>Bacillus sphaericus</i>	AF169495.1	1410 bp	ATCC
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	AB199591.2	1484 bp	DSM
ELB14, ELB31, ELB42 y ELB50	<i>Vibrio alginolyticus</i>	X56576.1	1483 bp	ATCC
	<i>Vibrio natriegens</i>	X74714.1	1466 bp	ATCC
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AF388386.1	1514 bp	ATCC
ELB34 y ELB46	<i>Microbacterium maritypicum</i>	AJ853910.1	1437 bp	DSM
	<i>Microbacterium oxydans</i>	Y17227.1	1466 bp	DSM
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	AJ491806.1	1490 bp	DSM
	<i>Microbacterium luteolum</i>	AB004718.1	1440 bp	ATCC
ELB37	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	AJ293463.1	1537 bp	ATCC
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AB294553.1	1538 bp	ATCC

Tabla C-2: Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a algunos aislamientos del octocoral *Eunicea* sp.

Aislamiento	Pruebas bioquímicas positivas	Gram	Sequenciación rDNA 16S	Posible género o especie
ELB34	TSI A/A; CIT ; MOT ; VP, GLU y LAC	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Microbacterium oxydans</i>
ELB11	TSI K/A CIT; MOT; VP;NIT; GLU	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Bacillus fusiformis</i>
ELB37	TSI A/A; CIT; MOT; VP ;NIT; GLU y LAC	BGN	No	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
ELB50	TSI A/A; CIT; MOT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Vibrio</i> sp.
ELB31	TSI A/A; CIT; NIT; VP; GLU, LAC and MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Vibrio</i> sp.
ELB42	TSI A/A; CIT; NIT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Vibrio</i> sp.
ELB53	A/A; CIT; MOT; VP; GLU, LAC and MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
ELB9	A/A; CIT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
ELB48	A/A; CIT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
ELB18	A/A; CIT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
ELB12	A/A; CIT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
ELB41	A/A; CIT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
ELB14	TSI A/A; CIT; NIT; VP; GLU, LAC y MAN	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Vibrio</i> sp.
ELB46	TSI A/A, MOT, VP, NIT, GLU y LAC	BGN	Si, ver tabla 4-1	<i>Microbacterium oxydans</i>
24	CIT	BGN	No	<i>Acinetobacter</i> sp.
25	CIT	BGN	No	<i>Acinetobacter</i> sp.
20a	CIT	BGN	No	<i>Acinenobacter</i> sp.
52a	TSI K/A, CIT, MOT, GLU	BGN	No	<i>Pseudomonas</i> sp.
10b	MOT; CIT.	BGN	No	<i>Alcaligenes</i> sp.
35b	K/A; MOT; CIT;VP; GLU	BGN	No	<i>Pseudomonas</i> sp.
26b	CIT	BGN	No	<i>Acinetobacter</i> sp.

Pruebas Bioquímicas realizadas: fermentación de glucosa (GLU) y Triple azúcar Hierro (ajar TSI), en caldos usando rojo de fenol como indicador de pH del medio, citratos (CIT- Agar Simmons), Lisina descarboxilasa (Agar LIA), Prueba acidez (Rojo metilo (MR)), Prueba acetoina (Voges Proskaver (VP)), Sulfuros/Indol/Movilidad (Medio SIM), Reducción de nitrato y Producción de H₂S. Las abreviaturas son para: Ácido (A), base (K), motilidad (MOT), lactosa (LAC), manitol (MAN) y nitratos (NIT).

Bibliografía

- Abràmoff, M.D., Hospitals, I. & Ram, S.J., 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), pp.36-42. Available at: <http://www.mendeley.com/research/image-processing-with-imagej/>.
- Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S., 2006. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 363(1-2), pp.83-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16165119> [Accessed August 9, 2010].
- Ainsworth, T.D., Fine, M. & Blackall, L.L., 2006. Fluorescence In Situ Hybridization and Spectral Imaging of Coral-Associated Bacterial Communities. *Society*, 72(4), pp.3016-3020.
- Amann, R.I., Ludwig, W & Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), pp.143-69. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Amann, R, Fuchs, B M & Behrens, S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), pp.231-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404099>.
- Amann, Rudolf & Fuchs, Bernhard M, 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews. Microbiology*, 6(5), pp.339-48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18414500>.
- Antônio, R.V. & Creczynski-Pasa, T.B., 2004. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. *Genetics and molecular research : GMR*, 3(1), pp.85-91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15100990>.
- Armougom, F. *et al.*, 2009. Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *European journal of clinical microbiology infectious diseases official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 28(9), pp.1151-1154. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19449045>.

- Barczak, A.K. & Hung, D.T., 2009. Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence. *Current opinion in microbiology*, 12(5), pp.490-6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2763366&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2011].
- Baxter, M. & Sieburth, J.M., 1984. Metabolic and ultrastructural response to glucose of two eurytrophic bacteria isolated from seawater at different enriching concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), pp.31-38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6696421>.
- Boyen, F. *et al.*, 2009. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary microbiology*, 135(3-4), pp.187-95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185433>.
- Brück, T.B. *et al.*, 2007. Diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate deep water octocorals *Leptogorgia minimata*, *Iciligorgia schrammi*, and *Swiftia exertia*. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 9(5), pp.561-76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17514404> [Accessed August 6, 2010].
- Burgess, J G *et al.*, 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of biotechnology*, 70(1-3), pp.27-32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412203>.
- Burgess, J Grant *et al.*, 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, 19 Suppl(1), pp.197-205. Available at: <http://www.informaworld.com/openurl?genre=article&doi=10.1080/0892701031000061778&magic=crossref>.
- Burke, C. *et al.*, 2011. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *The ISME journal*, 5, pp.590-600.
- Callow, M. & Fletcher, R., 1994. The influence of low surface energy materials on bioadhesion — a review. *International Biodeterioration Biodegradation*, 34(3-4), pp.333-348. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0964830594900922>.
- Cao, Shan *et al.*, 2010. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, 56(7), pp.598-612. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11434-010-4158-4> [Accessed May 20, 2011].
- Castro, V., Castellanos, L. & Arévalo-ferro, C., 2008. *Detección de comunicación intercelular, mediada por acil-homoserinlactonas, en bacterias marinas del mar Caribe Colombiano*. Universidad Nacional de Colombia.

- Choo, J.H., Rukayadi, Y. & Hwang, J.-K., 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in applied microbiology*, 42(6), pp.637-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16706905> [Accessed June 7, 2011].
- Claesson, M.J. *et al.*, 2009. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PloS one*, 4(8), p.e6669. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693277>.
- Cole, J.R. *et al.*, 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for ARNr analysis. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), p.D141-D145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004872>.
- Coleman, J.R. *et al.*, 2007. mRNA-targeted fluorescent in situ hybridization (FISH) of Gram-negative bacteria without template amplification or tyramide signal amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 71(3), pp.246-255. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949838>.
- Connon, S.A. & Giovannoni, S.J., 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), p.3878. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/68/8/3878> [Accessed June 7, 2011].
- De Bruyn, J.C. *et al.*, 1990. Floating Filters, a Novel Technique for Isolation and Enumeration of Fastidious, Acidophilic, Iron-Oxidizing, Autotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), pp.2891-2894. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184860&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- de Kievit, T.R. & Iglewski, B.H., 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, 68(9), pp.4839-4849. Available at: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000>.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. & Pace, N.R., 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243(4896), pp.1360-1363. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466341>.
- Delort, E. *et al.*, 2000. Analysis of initial fouling process in coastal environment: effects of settlement, attachment, and metamorphosis promoters. *Marine Biotechnology*, 2(3), p.224-230. Available at: <http://www.springerlink.com/index/NBA7U6HYYPQAQTWEQ.pdf> [Accessed June 9, 2011].
- Diggle, S.P., Crusz, S.A. & Cámara, M., 2007. Quorum sensing. *Current Biology*, 17(21), p.R907-R910. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230668>.

- Dobretsov, S., 2004. The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299(1), pp.35-50. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002209810300443X>.
- Dobretsov, S.V. & Qian, Pei-Yuan, 2002. Effect of Bacteria Associated with the Green Alga *Ulva reticulata* on Marine Micro- and Macrofouling. *Biofouling*, 18(3), pp.217-228. Available at: <http://www.informaworld.com/openurl?genre=article&doi=10.1080/08927010290013026&magic=crossref>.
- Dobretsov, S., Teplitski, M. & Paul, V., 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*, 25(5), pp.413-427. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306145>.
- Dong, Y.-h, Wang, L.-y & Zhang, L.-H., 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1483), pp.1201-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360274>.
- Dove, S.G., Hoegh-Guldberg, O. & Ranganathan, S., 2001. Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. *Coral Reefs*, 19(3), pp.197-204. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/PL00006956>.
- Edwards, R.A. *et al.*, 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, 7(1), p.57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549033>.
- Egan, S. *et al.*, 2000. Brief report Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology*, 2(3), pp.343-347.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. & Greenberg, E.P., 1994. MINIREVIEW Quorum Sensing in Bacteria : the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. , 176(2), pp.269-275.
- Fusetani, N. & Clare, A., 2006. *Antifouling Compounds*, Alemania: Springer.
- Gall, J.G. & Pardue, M.L., 1969. Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2), pp.378-383. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.63.2.378>.
- Geske, G.D., O'Neill, J.C. & Blackwell, H.E., 2008. Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Soc Rev.*, 37(7), pp.1432-1447. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/306/5703/1895.short> [Accessed June 7, 2011].

- Gobbetti, M. *et al.*, 2007. Cell-cell communication in food related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), pp.34-45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617483>.
- Greenberg, E.P., 2003. Bacterial communication and group behavior. *Journal of Clinical Investigation*, 112(9), pp.1288-1290. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02705033>.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), pp.95-108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040259> [Accessed July 12, 2010].
- Harder, Tilmann *et al.*, 2003. A distinctive epibiotic bacterial community on the soft coral *Dendronephthya* sp. and antibacterial activity of coral tissue extracts suggest a chemical mechanism against bacterial epibiosis. *Fems Microbiology Ecology*, 43(3), pp.337-347. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719665>.
- Hernández-Zárate, G. & Olmos-Soto, J., 2006. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Journal of applied microbiology*, 100(4), pp.664-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16553721> [Accessed July 13, 2010].
- Holt, J. *et al.*, 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. W. and Wilkins., ed., Maryland. Baltimore.
- Joint, I., Tait, K. & Wheeler, G., 2007. Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1483), p.1223--33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jones, W.J., 2009. High-Throughput Sequencing and Metagenomics. *Estuaries and Coasts*, 33(4), pp.944-952. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12237-009-9182-8> [Accessed February 17, 2011].
- Karasawa, S. *et al.*, 2004. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *The Biochemical journal*, 381(Pt 1), pp.307-312. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1133789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kimura, S. *et al.*, 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. *Microbiology*, 155(Pt 6), pp.1934-1939. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19383702.

Kjelleberg, Staffan & Molin, S., 2002. Is there a role for *Quorum Sensing* signals in bacterial biofilms ? *Current Opinion in Microbiology*, 5, pp.254-258.

Knowlton, N. & Rohwer, F., 2003. Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: the host as a habitat. *The American naturalist*, 162(4 Suppl), pp.S51-62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583857>.

Kocielek, M.G., 2009. Quorum-Sensing Inhibitors and Biofilms. *Biofilms*, pp.315-326.

Kolter, R., 2005. Surfacing views of biofilm biology. *Trends in microbiology*, 13(1), pp.1-2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15639623> [Accessed August 27, 2010].

Kubota, K. *et al.*, 2008. Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *Journal of Microbiological Methods*, 72(1), pp.54-59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022717>.

Lampert, Y. *et al.*, 2008. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. *FEMS microbiology ecology*, 64(2), pp.187-98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18355296>.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S ARNr sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics M. G. Erko Stackebrandt, ed. *J Wiley Sons Chichester*, p, p.115–175. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:16S/23S+ARNr+sequencing#0>.

Larkin M. A., Blackshields G., B.N.P. *et al.*, 2007. ClustalW2 and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23, p.2947.

Lee, N., 2010. In situ detection of microbial structure and function in the environment. In *Protocols for FISH course (lab part)*.

Lee, O.O. *et al.*, 2011. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *The ISME journal*, 5(4), pp.650-664. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085196>.

Lemon, K.P. *et al.*, 2008. Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 322, p.16. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/306/5703/1895.short> [Accessed June 7, 2011].

Li, X.Z., Hauer, B. & Rosche, B., 2007. Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), pp.1255-62.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653709> [Accessed June 7, 2011].
- Littman, R. a *et al.*, 2009. Diversities of coral-associated bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great Barrier Reef. *FEMS microbiology ecology*, 68(2), pp.152-63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302548>.
- Ma, Y. *et al.*, 2009. Inhibition of common fouling organisms in mariculture by epiphytic bacteria from the surfaces of seaweeds and invertebrates. *Acta Ecologica Sinica*, 29(4), pp.222-226. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872203209000456> [Accessed June 7, 2011].
- Mardis, E.R., 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, pp.387-402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18576944>.
- Margulies, M. *et al.*, 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), pp.376-80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056220>.
- McLean, R.J.C., Pierson, L.S. & Fuqua, C., 2004. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of microbiological methods*, 58(3), pp.351-60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279939> [Accessed February 24, 2011].
- Miller, M.B. & Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), p.165–199. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.55.1.165> [Accessed June 7, 2011].
- Mora-Cristancho, A. *et al.*, 2011. Antifouling activities against colonizer marine bacteria of extracts from marine invertebrates collected in the Colombian Caribbean sea and in the Brazilian coast (Santa Catarina). *Naturforschung*, Accepted u.
- Morikawa, M., 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(1), pp.1-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503283>.
- Nakamura, L.K., 2000. Phylogeny of *Bacillus sphaericus*-like organisms. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 5, pp.1715-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034479>.
- Ni, N. *et al.*, 2008. Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochemical and biophysical research communications*,

- 369(2), pp.590-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295599> [Accessed October 21, 2010].
- Nithya, C., Aravindraja, C. & Pandian, S.K., 2010. *Bacillus Pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria. *Research in microbiology*, 161(4), pp.293-304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381609> [Accessed June 7, 2011].
- Nold, S.C., Kopczynski, E.D. & Ward, D.M., 1996. Cultivation of aerobic chemoorganotrophic proteobacteria and gram-positive bacteria from a hot spring microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), pp.3917-21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Penesyán, A. *et al.*, 2009. Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *FEMS microbiology ecology*, 69(1), pp.113-24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453738>.
- Penn, K. *et al.*, 2006. Characterization of Bacterial Communities Associated with Deep-Sea Corals on Gulf of Alaska Seamounts †. *Society*, 72(2), pp.1680-1683.
- Persson, T. *et al.*, 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(2), pp.253-262. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15632967.
- Piatkevich, K.D. *et al.*, 2010. Red fluorescent proteins and their properties. *Russian Chemical Reviews*, 79(3), pp.243-258. Available at: <http://stacks.iop.org/0036-021X/79/i=3/a=R06?key=crossref.1777e4174172367f48cd3cbb0da0fbe6> [Accessed October 18, 2010].
- Portillo, E., 2002. Control biológico del fouling en tanques de cultivo de macroalgas mediante el gasterópodo *Osilinus atratus* (Wood, 1828). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr*, 18(1-4), p.401-40. Available at: [http://dmz-madrid.md.ieo.es/publicaciones/boletin/pdfs/bol18/18\(1-4\)401-404.pdf](http://dmz-madrid.md.ieo.es/publicaciones/boletin/pdfs/bol18/18(1-4)401-404.pdf) [Accessed June 7, 2011].
- Qian, P-Y *et al.*, 2007. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 9(4), pp.399-410. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17497196> [Accessed May 19, 2011].

- Rao, D. *et al.*, 2007. Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Applied and environmental microbiology*, 73(24), pp.7844-52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965210>.
- Rao, D., Webb, J.S. & Kjelleberg, Staffan, 2006. Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. *Applied and environmental microbiology*, 72(8), pp.5547-55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885308>.
- Rasmussen, T B *et al.*, 2000. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology (Reading, England)*, 146 Pt 12, pp.3237-44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101681>.
- Rasmussen, Thomas B & Givskov, Michael, 2006a. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 4), pp.895-904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549654>.
- Rasmussen, Thomas B & Givskov, Michael, 2006b. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 296(2-3), pp.149-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503194>.
- Reh fuss, M. & Urban, J., 2005. *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Systematic and applied microbiology*, 28(5), pp.421-429.
- Ren, D. & Wood, T.K., 2004. (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone reduces corrosion from *Desulfotomaculum orientis*. *Environmental microbiology*, 6(5), pp.535-40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15049927> [Accessed June 7, 2011].
- Reverchon, S. *et al.*, 2002. New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(8), pp.1153-1157.
- Ritchie, K., 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 322, pp.1-14. Available at: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v322/p1-14/>.
- Ritossa, F.M. & Spiegelman, S., 1965. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53(4), pp.737-745.
- Roche Diagnostics, 2002. *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual* R. D. GMBH, ed.,

- Rosenberg, E., Kellogg, C.A. & Rohwer, F., 2007. Coral microbiology. *Oceanography*, 20(2), p.147. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261903>.
- Rudkin, G.T. & Stollar, B.D., 1977. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature*, 265(5593), pp.472-473.
- Sabdon, A. & Radjasa, O.K., 2006. Antifouling activity of bacteria associated with soft coral *sarcophyton* sp. Against marine biofilmforming bacteria. *Journal of Coastal Development*, 10(1), p.56–62. Available at: <http://eprints.undip.ac.id/472/> [Accessed June 8, 2011].
- Schloss, P.D. & Handelsman, J., 2005. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), pp.1501-1506. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/71/3/1501>.
- Schut, F. *et al.*, 1993. Isolation of Typical Marine Bacteria by Dilution Culture: Growth, Maintenance, and Characteristics of Isolates under Laboratory Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), pp.2150-2160. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Seipp, S. *et al.*, 2007. Metamorphosis of *Hydractinia echinata*--natural versus artificial induction and developmental plasticity. *Development genes and evolution*, 217(5), pp.385-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17394014> [Accessed February 20, 2011].
- Shendure, J. & Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), pp.1135-45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846087>.
- Skindersoe, M.E. *et al.*, 2008. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 10(1), pp.56-63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952508>.
- Skovhus, T.L. *et al.*, 2007. Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. *Fems Microbiology Ecology*, 61(2), pp.348-361. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573938>.
- Sogin, M.L. *et al.*, 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), pp.12115-12120. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1524930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Stewart, P.S. & Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews. Microbiology*, 6(3), pp.199-210. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264116>.
- Suga, H. & Smith, K.M., 2003. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), pp.586-591. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593103001030> [Accessed April 29, 2011].
- Tamura, K. *et al.*, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), pp.1596-1599. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738>.
- Tavender, T.J. *et al.*, 2008. LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-phosphate. *BMC microbiology*, 8, p.98. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2443158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 27, 2010].
- Valencia, H.A., 2004. *Manual de practicas de microbiología básica* Notas de c. Facultad de Ciencias, eds., Unibiblos.
- Vendeville, A. *et al.*, 2005. Making “sense” of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 3(5), pp.383-96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864263>.
- Wahl, M., 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects Martin. *Marine Ecology Progress Series*, 58, pp.175-189. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0032386175901573> [Accessed June 7, 2011].
- Watnick, P. & Kolter, R., 2000. MINIREVIEW-Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), p.2675–2679. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:MINIREVIEW+Biofilm,+City+of+Microbes#0> [Accessed June 7, 2011].
- Wheeler, G.L. *et al.*, 2006. Acyl-homoserine lactones modulate the settlement rate of zoospores of the marine alga *Ulva intestinalis* via a novel chemokinetic mechanism. *Plant, Cell and Environment*, 29(4), pp.608-618. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2005.01440.x> [Accessed June 6, 2011].
- Williams, P. & Cámara, M., 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current opinion in microbiology*, 12(2), pp.182-91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249239>.
- Wilson, G.S. *et al.*, 2010. Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. *Microbiological research*, 165(4), pp.300-

11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656668> [Accessed August 11, 2010].

Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution Background. *Microbiology*, 51(2), pp.221-271.

Yu, Z. & Morrison, M., 2004. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), pp.4800-4806. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/70/8/4800>.

Zhiryakova, D. *et al.*, 2009. Hydrolysis of phenylacetanilides catalyzed by penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*: Sensitivity of the reaction to substitution in the leaving group. *Catalysis Communications*, 11(3), pp.196-201.

Zhiryakova, Diana *et al.*, 2009. Do N-terminal nucleophile hydrolases indeed have a single amino acid catalytic center? *The FEBS journal*, 276(9), pp.2589-2598.

Zobell, C.E. & Allen, E.C., 1935. The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *Journal of bacteriology*, 29(3), pp.239-51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15559972>.

Zoetendal, E.G. *et al.*, 2001. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Systematic and applied microbiology*, 24(3), pp.405-410. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11822677>.

Zwirgmaier, K., Ludwig, Wolfgang & Schleifer, K.-H., 2003. Improved fluorescence in situ hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. *Systematic and applied microbiology*, 26(3), pp.327-37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529175>.