



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de medicina

Grado en Nutrición Humana y Dietética 2016-2017

Trabajo de fin de grado

**Estudio de *quorum sensing* en  
*Cronobacter sakazakii* mediante bioensayo  
con *Chromobacterium violaceum***

Autor: Miguel Ángel Pérez Espartero

Tutor: Emiliano J. Quinto Fernández

## RESUMEN

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo de comunicación entre bacterias, que ha sido asociado con un importante número de procesos fisiológicos, como la regulación de la virulencia o la formación de biofilms. Las Acil homoserina lactonas (acil-HSLs) son moléculas de señalización del QS usadas por bacterias gram-negativas. *Chromobacterium violaceum* es una bacteria Gram-negativa que produce un pigmento purpura (violaceina) en presencia de acil-HSLs de cadena corta. La cepa mutante, *C. violaceum* CV026, es deficiente en la producción de esta molécula de señalización, pero mantiene la capacidad de sintetizar violaceina en respuesta a la presencia de Acil-HSLs de cadena corta. En este bioensayo, hemos utilizado la cepa *C. violaceum* CV026 para detectar si la bacteria *Cronobacter sakazakii* produce Acil-HSLs de cadena corta.

**PALABRAS CLAVE:** *Quorum sensing*, *Cronobacter sakazakii*, *Chromobacterium violaceum*, violaceina, N-acil homoserina lactonas.

## ABSTRACT

*Quorum Sensing* (QS) is a mechanism of communication between bacteria, which has been associated with a number of important physiological processes including virulence regulation and biofilm formation. The Acyl homoserine lactones (acyl-HSLs) are used as extracellular QS signals by Gram-negative bacteria. *Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative bacterium that produces the purple pigment (violacein) in response to the presence of the short-chain Acyl-HSLs. The mutant strain, *C. violaceum* CV026, is deficient in the production of this signal molecule but retains the ability to synthesize violacein in response to the presence of short-chain Acyl-HSLs. In this bioassay, we used the *C. violaceum* CV026 strain to detect whether the bacterium *Cronobacter sakazakii* produces short-chain Acil-HSLs.

**KEYWORDS:** *Quorum sensing*, *Cronobacter sakazakii*, *Chromobacterium violaceum*, violacein, N-acyl homoserine lactones.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Descubrimiento del <i>quorum sensing</i> .....	1
1.2. Clasificación de los sistemas de <i>quorum sensing</i> .....	3
1.3. <i>Cronobacter sakazakii</i> .....	6
1.4. Bioensayo con <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	7
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>8</b>
3.1. Materiales.....	8
3.2. Recuperación de las bacterias liofilizadas.....	8
3.3. Cultivo de los microorganismos.....	9
3.4. Bioensayo en placa indicador de acil-HSL.....	10
3.5. Bioensayo con sobrenadante de <i>C. sakazakii</i> .....	11
3.6. Bioensayo con sobrenadante concentrado de <i>C. sakazakii</i> .....	12
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>13</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>18</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>18</b>

# 1. Introducción

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo de comunicación entre células mediante el cual las bacterias son capaces de saber cuántas son a través de la producción y detección de la acumulación de una molécula de señalización que secretan a su entorno y así pueden conocer el momento en el que deben actuar para desarrollar sus funciones de la forma más eficaz (1). A esta molécula de señalización también se la denomina autoinductor, porque ella misma es capaz de estimular su propia síntesis (2).

Cuando la concentración bacteriana es reducida, el autoinductor se forma y se excreta en baja cantidad. Pero, a medida que aumenta el número de bacterias, estos autoinductores se van acumulando en el medio extracelular, de tal forma que una vez que se llega a un umbral en la concentración de la molécula (y, por lo tanto, a una concentración bacteriana específica) se induce la expresión de una serie de genes que genera un cambio coordinado en el comportamiento del grupo bacteriano (1).

## 1.1 Descubrimiento del *quorum sensing*

En 1972, Eberhard (3) estudió la bacteria marina *Vibrio fischeri*, la cual, al ser cultivada en el laboratorio a altas densidades celulares, emitía luminiscencia. Lo primero que se descubrió es que este microorganismo forma relaciones simbióticas con algunas especies de calamares (*Euprymna scolopes*). De este modo, la bacteria obtiene un lugar seguro donde vivir, y por su parte el calamar puede alejarse de los depredadores gracias a la luz emitida por las bacterias. En el año 1977, Nealson (4), estudiando el fenómeno de la bioluminiscencia en *Vibrios* marinos, define el término autoinducción (5). Finalmente, la molécula producida por *V. fischeri* fue identificada en 1981 por Eberhard et al. (6) como N-acil-homoserina-lactona. En 1994, el término autoinducción es rebautizado por Fuqua et al. (7), por el de “*Quorum Sensing*” o percepción de quórum en castellano. Quedando definido como “el mecanismo bacteriano de comunicación intercelular que controla la expresión génica en función de la densidad celular” (5).

Desde el año 1994 hasta la actualidad, se han descrito numerosos procesos fisiológicos regulados por QS, tales como (8):

- Bioluminiscencia.
- Maduración de biofilms.
- Pigmentación.
- Producción de algunos metabolitos secundarios.
- Inducción del proceso de esporulación.
- Producción de exopolisacáridos.
- Producción de factores de virulencia por microorganismos patógenos en humanos, animales y vegetales.
- Motilidad.
- Transferencia de plásmidos conjugativos.
- Inducción de la competencia en bacterias.

### **Autoinductores**

Hay una serie de criterios que deben cumplir los autoinductores para que puedan ser considerados como señales de QS (1), (9):

1. La producción de la señal de QS debe llevarse a cabo durante etapas específicas de crecimiento, o en respuesta particular a cambios ambientales.
2. La señal de QS debe poder acumularse en el ambiente extracelular y ser reconocida por las bacterias receptoras.
3. La acumulación de la señal de QS por encima de un umbral crítico de concentración debe estimular una respuesta.
4. La respuesta celular debe extenderse más allá de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar la molécula.

Existen 3 tipos de autoinductores (1), (10):

**-Autoinductores tipo 1 o acil-homoserina-lactonas (Acil-HSLs):** se encargan de la comunicación entre bacterias gram-negativas que pertenecen a la misma especie. Las Acil-HSLs son productos de sintetetas autoinductoras tipo LuxI. Estas pequeñas moléculas son detectadas por las proteínas citoplasmáticas afines LuxR que, al acoplarse con el autoinductor, se unen a la secuencia promotora llamada *lux-box* y de

esta forma activan la transcripción de genes de QS (11). Las Acil-HSLs producidas por las diferentes especies de microorganismos gram-negativos difieren en la longitud de la cadena acil y en la presencia de un grupo metileno, oxo o hidroxilo en la posición C-3 (12).

**-Oligopéptidos:** se encargan de la comunicación entre bacterias gram-positivas que pertenecen a la misma especie. Son reconocidos por receptores de la membrana. La transducción de la señal se produce por cascadas bioquímicas de fosforilación que finalmente interaccionan con los factores de transcripción del ADN activándose así la expresión de los genes de QS (13).

**-Autoinductores tipo 2:** moléculas producidas por bacterias gram-positivas y gram-negativas que se encargan de la comunicación entre bacterias pertenecientes a diferentes especies. A este tipo de comunicación entre organismos de diferente especie se le denomina *cross-talk*. Son productos derivados del metabolismo bacteriano. Poseen estructura dihidroxipentandiona o DPD, por lo que este tipo de autoinductores también son conocidos mediante las siglas DPD (14).

## **1.2. Clasificación de los sistemas de *quorum sensing***

### **Sistemas de *quorum sensing* con un autoinductor**

Son los sistemas más sencillos y los primeros que se empezaron a estudiar. Dentro de estos sistemas los más representativos son los modelos descritos para las bacterias gram-negativas (ej. *V. fischeri*) y las bacterias gram-positivas (ej. *Staphylococcus aureus*) (5).

#### **• Gram-negativas:**

Este fue el primer sistema biológico regulado por QS descrito en la bacteria *V. fischeri*, simbiote del calamar Hawaiano *Euprymna scolopes* y responsable de su bioluminiscencia.

El sistema de QS desarrollado por esta bacteria es el más sencillo descrito; tiene un único autoinductor, una acil-HSL. El sistema está regulado por el operón *luxI/luxR*, que de forma constitutiva expresa niveles basales de la proteína LuxI (proteína que sintetiza el autoinductor) y la proteína receptora del mismo Lux R.

Cuando la concentración de la bacteria es muy baja la molécula autoinductora se produce en muy baja concentración y es secretada por difusión al medio extracelular donde se acumula. En estas condiciones, la bacteria no produce luz. Cuando los microorganismos se reproducen y alcanzan valores de  $10^{10}$ - $10^{11}$  células/ml, la concentración de autoinductor está en torno a 1-10 nM. En esas circunstancias el autoinductor entra al interior de la célula, también por difusión y se une a su proteína receptora LuxR, momento en el que se induce la expresión del operón *luxI/luxR* sintetizándose la proteína receptora LuxR y la sintetasa del autoinductor LuxI, produciéndose una autoinducción del sistema. La unión del autoinductor a su proteína receptora LuxR induce también la expresión del operón luciferasa *luxC, D, A, B, E*, con la correspondiente producción de bioluminiscencia (15).

• **Gram-positivas:**

Las moléculas autoinductoras en bacterias gram-positivas son oligopéptidos modificados. Estas moléculas, a diferencia de las acil-HSLs son muy específicas y confieren a la cepa que las posee capacidad de comunicarse de forma intraespecífica. Los oligopéptidos no difunden a través de la membrana plasmática y necesitan un transportador específico, que generalmente modifica la estructura del autoinductor. También necesita dos receptores: una histidín-quinasa de membrana y una proteína que interaccione con el ADN y active la transcripción. La señal producida se transmite por una cascada de fosforilación/defosforilación. Por tanto, este mecanismo es mucho más complejo que el descrito en bacterias gram-negativas.

El ejemplo más sencillo de estos sistemas de QS es el descrito en la bacteria *S. aureus*. Schertzer et al. (16). Se trata de una bacteria de la microbiota normal del ser humano, que en determinadas circunstancias se convierte en virulenta e invade los tejidos. Este microorganismo desarrolla una estrategia bifásica para generar su patogenicidad. Cuando se encuentra a bajas concentraciones, *S. aureus* expresa factores proteicos que le permiten adherirse y colonizar superficies. Sin embargo, a elevadas concentraciones celulares la síntesis de estos factores se reprime y comienza a secretar factores de virulencia.

## **Sistemas de quorum sensing con dos o más autoinductores**

En general, los sistemas bacterianos regulados por QS son muchos más complejos que los anteriormente descritos, y generalmente tienen dos o más moléculas autoinductoras. Así pues, dentro de estos sistemas podemos encontrar dos tipos en función de la forma en que actúan los autoinductores: **sistemas cooperativos** y **sistemas competitivos** (5).

### **• Sistemas cooperativos**

Son aquellos en los que la acción de las distintas moléculas autoinductoras tiene una acción positiva sobre los mismos. Dentro de estos sistemas se encuentran:

-**Circuitos en paralelo:** aquellos en los que las moléculas autoinductoras se producen a la vez y tienen un efecto positivo sinérgico sobre el sistema que regulan. El caso más destacable de estos circuitos es el del sistema que regula la bioluminiscencia en *V. harveyi*.

-**Circuitos en serie:** aquellos en los que las moléculas autoinductoras se producen secuencialmente ejerciendo un efecto beneficioso sobre el sistema que regulan. Uno de los ejemplos clásicos es el de la regulación de la inducción a la patogenicidad en *Pseudomonas aeruginosa*.

### **• Sistemas competitivos**

Son aquellos en los que la acción de las moléculas autoinductoras tiene efectos antagónicos sobre el proceso que regulan. Los mecanismos biológicos regulados por sistemas de QS de tipo competitivo son aquellos que implican el desarrollo de vías alternativas, es decir, que el desarrollo de uno implica la inhibición de su alternativo, como es el caso del mecanismo que regula la formación de las esporas de resistencia en bacterias del género *Bacillus* y su entrada en estado de competencia para el desarrollo de fenómenos de tipo sexual.



### 1.3. *Cronobacter sakazakii*

*Cronobacter sakazakii* es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es un patógeno oportunista asociado con meningitis, enterocolitis necrotizante y sepsis en neonatos y pacientes inmunocomprometidos (17).

A pesar de que la incidencia de la enfermedad es baja, el índice de mortalidad puede llegar hasta el 80 % y los casos infantiles han sido relacionados epidemiológicamente con la ingestión de fórmulas infantiles en polvo contaminadas (18), (19). Investigaciones sobre brotes de infecciones de *C. sakazakii* en hospitales indican que la formula infantil en polvo es una fuente común de contaminación, tanto en botes cerrados como en leche reconstituida (20) (21) (22) (23). La presencia de *C. sakazakii* en utensilios y equipamiento de procesamiento de leche puede deberse a su capacidad de adherirse y formar biofilms en muchas superficies, incluyendo silicona, látex, policarbonato (usado en la fabricación de botellas), vidrio, cloruro de polivinilo (PVC) y acero inoxidable (20), (21), (24). Además, también hay informes de que el *Cronobacter sakazakii* tiene la capacidad de sobrevivir bajo condiciones de deshidratación durante varias semanas y es resistente al estrés osmótico, lo que puede ser debido a la formación de biofilms (18), (25).

Lehner et al. (9) investigaron la capacidad de *C. sakazakii* para producir acil-HSL usando cromatografía de capa fina y detectaron dos moléculas: 3-oxo-hexanoyl-HSL (OHHL) y 3-oxooctanoyl-HSL (OOHL). Pinto et al. (26) detectaron acil-HSL de cadena corta en *C. sakazakii* mediante bioensayos con *C. violaceum* CV026, aunque el aislamiento y la caracterización química completa de estas moléculas no se realizó.

Esta señalización intercelular junto con otros factores genéticos y ambientales han sido descritos como los involucrados en la formación de biofilm en bacterias (18), (27), (28). Por lo tanto, la interferencia de este fenómeno por medio de inhibidores del QS podría ser un acercamiento interesante para prevenir o reducir las infecciones basadas en biofilm.

## 1.4. Bioensayo con *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* es una bacteria Gram-negativa que se encuentra comúnmente en suelos y aguas y que produce un pigmento púrpura característico denominado violaceína, cuya producción está regulada por la C<sub>6</sub>-HSL. Los genes sintetizadores y reguladores de la C<sub>6</sub>-HSL son *cviI* y *cviR*, respectivamente, y son homólogos del *luxI* y el *luxR* (29), (30). Existe una cepa albina de *C. violaceum* denominada CV026 que es incapaz de producir Acil-HSLs, pero es totalmente capaz de producir violaceína en respuesta a moléculas de señalización C<sub>6</sub>-HSL o C<sub>4</sub>-HSL. Esto permite que esta cepa pueda ser utilizada como cepa indicadora en bioensayos a través de su capacidad de producir pigmentación ante la presencia de Acil-HSLs exógenas (31).

Como control positivo para el bioensayo, se utiliza una cepa que produzca C<sub>6</sub>-HSL como *C. violaceum* ATCC 31532 o *C. violaceum* ATCC 12472 (32). Si se siembran en placa, la pigmentación es fácilmente visible después de 24 horas de cultivo aunque se ha observado que en algunos cultivos de CV026 la pigmentación tarda en aparecer más de 48 horas (29).

## 2. Objetivos

Puesta a punto de la técnica del bioensayo con *C. violaceum* para la detección de Acil-HSLs implicados en el *Quorum sensing*.

En particular, se desea:

- Comprobar si *C. sakazakii* CECT 858 produce Acil-HSLs de cadena corta mediante la técnica de siembra en superficie en placa.
- Comprobar si *C. sakazakii* CECT 858 produce Acil-HSLs de cadena corta utilizando sobrenadante en tubo.
- Comprobar si *C. sakazakii* CECT 858 produce Acil-HSLs de cadena corta utilizando sobrenadante concentrado en tubo.
- Comprobar si existe diferencia en la detección de Acil-HSLs al utilizar medio TSB/TSA en lugar del LB.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Materiales

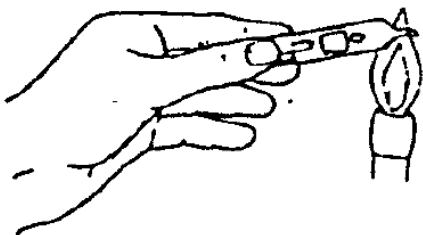
1. *C. violaceum* CV026 (CECT 5999) (cepa biosensora).
2. *C. violaceum* ATCC 12472 (CECT 494) (control positivo).
3. *C. sakazakii* ATCC 29544 (CECT 858) (cepa problema).
4. Medio LB y TSB.
5. Agar LB y TSA.
6. Pacas de Petri.
7. Asas de siembra.
8. Tubos de ensayo.
9. Tubos Eppendorf.
10. Agitador vortex.
11. Mechero bunsen.
12. Autoclave.
13. Centrifugadora.
14. Incubadora a 37 °C y 28 °C.
15. Micropipetas (10 -1000 µl) y puntas estériles desechables.

#### 3.2. Recuperación de las bacterias liofilizadas

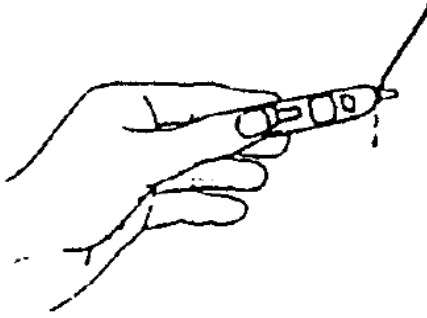
*C. violaceum* CECT 5999, *C. violaceum* CECT 494 y *C. sakazakii* CECT 858 fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en forma de liófilo, por lo que deben recuperarse para poder ser utilizadas.

##### Apertura de la ampolla

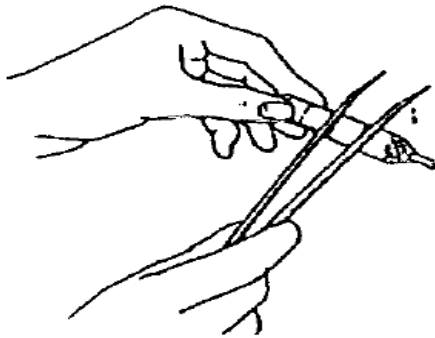
1. Calentamiento de la punta a la llama.



2. Resquebrajado del vidrio con agua estéril.



3. Retirada de los fragmentos de vidrio.



### **Resuspensión del liófilo y siembra**

1. Resuspensión: Con ayuda de una pipeta Pasteur se añaden 0.3 ml de medio TSB estéril a la ampolla de vidrio abierta. Se resuspenda cuidadosamente el liófilo ayudándose de la pipeta Pasteur para aspirar y expulsar la suspensión.
2. Siembra: se utiliza toda la suspensión para inocular una placa Petri con agar LB y un tubo con 5 ml de caldo LB.
3. Incubación: a 30 °C durante 24 horas.

### **3.3. Cultivo de los microorganismos**

Se realizaron pases cada 24-48 horas en tubos eppendorf conteniendo 1 ml de TSB. Las cepas de *C. violaceum* se incubaron a 30 °C y *C. sakazakii* se incubó a 37 °C.

### 3.4. Bioensayo en placa indicador de acil-HSL (29)

1. Se realiza un cultivo de cada una de las cepas en medio LB y en TSB. CV026 y ATCC 12472 a 30 °C durante 24 horas y *C. sakazakii* a 37 °C durante 24h.
2. Se siembran el *C. sakazakii* y el CV026 de la forma que se muestra en la Figura 1 en una placa con agar LB (se utilizan las cepas cultivadas en LB) y en otra con TSA (se utilizan las cepas cultivadas en TSB).
3. Como control positivo, se siembra CV026 y *C. violaceum* ATCC 12472 de la misma manera, tanto en LB como en TSA.
4. Como control negativo, se siembra CV026 contra sí misma (como indicador y como prueba) en LB y TSA.
5. Se incuban durante 24h a 30 °C y se comprueba la inducción de la producción de pigmento azul-violeta en el control positivo y en la placa problema. Debería verse una coloración azul-violeta en la cepa CV026 si el organismo de prueba produce HSLs de 2 a 8 átomos de carbono en la cadena lateral (33) y una falta de pigmentación si no los produce.
6. Si no hay coloración, se incuban otras 24h a 30 °C y se vuelve a comprobar si se ha producido coloración.

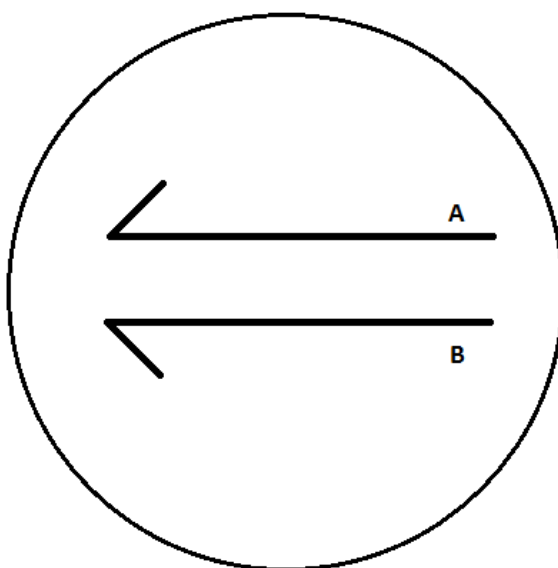


Fig. 1. Patrón de sembrado de placas para el bioensayo con *C. violaceum*. (A) Cepa problema (*C. sakazakii*). (B) Cepa biosensora (*C. violaceum*).

### 3.5. Bioensayo con sobrenadante de *C. sakazakii* (20)

1. Se recultivan cada una de las cepas en medio LB. CV026 y ATCC 12472 a 30 °C durante 24 horas y *C. sakazakii* a 37 °C durante 24h.
2. Se preparan 3 tubos eppendorf con 800 µl de LB y se inoculan con 100 µl de CV026.
3. Se prepara 1 tubo eppendorf con 800 µl de LB y se inocula con 100 µl de ATCC 12472.
4. Se prepara 1 tubo eppendorf con 1300 µl de LB y se inocula con 200 µl de *C. sakazakii*.
5. Se incuban los tubos durante 24 horas a 30 °C (CV026 y ATCC 12472) y 37 °C (*C. sakazakii*).
6. Se centrifuga el tubo con *C. sakazakii* a 2500 rpm durante 10 minutos y se extrae el sobrenadante y se filtra.
7. Se llena un tubo eppendorf con 900 µl de sobrenadante y se le añaden 100 µl de CV026 (proporción 9:1).
8. A uno de los tubos con 900 µl de CV026 se le añaden 100 µl de sobrenadante (proporción 1:9).
9. Para el control positivo, al tubo de 900 µl de ATCC 1247 se le añaden 100 µl de CV026.
10. Para el control negativo, a otro de los tubos de 900 µl de CV026 se le añaden 100 µl de CV026.
11. Se incuban los tubos durante 24h a 30 °C y se comprueba la inducción de la producción de pigmento azul-violeta en el control positivo y en el tubo problema. Debería verse una coloración azul-violeta si el organismo de prueba produce HSLs de 2 a 8 átomos de carbono en la cadena lateral (33) y una falta de pigmentación si no los produce.
12. Si no hay coloración, se incuban otras 24h a 30 °C y se vuelve a comprobar si se ha producido coloración.

### **3.6. Bioensayo con sobrenadante concentrado de *C. sakazakii* (20)**

1. Se recultiva la cepa CV026 a 30 °C durante 24 horas en medio LB y en TSB.
2. El sobrenadante de *C. sakazakii* se concentró a partir de un volumen de 10 ml sometido a 50 °C, 30 rpm, 60 minutos y condiciones de vacío en el evaporador rotatorio (Heidolph Instruments GmbH & co. Schwabach, Germany). Finalmente, el concentrado se reconstituyó al 20% (se añaden 2 ml de TSB al concentrado evaporado) en TSB justo en el momento previo a su uso (34).
3. Se llena un tubo eppendorf con 90 µl de sobrenadante concentrado y se le añaden 10 µl de CV026 (cultivado en LB) (proporción 9:1).
4. Se llena un tubo eppendorf con 90 µl de sobrenadante concentrado y se le añaden 10 µl de CV026 (cultivado en TSB) (proporción 9:1).
5. Se llena un tubo con 90 µl de CV026 (cultivado en LB) y se le añaden 10 µl de sobrenadante concentrado (proporción 1:9).
6. Se llena un tubo con 90 µl de CV026 (cultivado en TSB) y se le añaden 10 µl de sobrenadante concentrado (proporción 1:9).
7. Se incuban los tubos durante 24h a 30 °C y se comprueba la inducción de la producción de pigmento azul-violeta en el control positivo y en el tubo problema. Debería verse una coloración azul-violeta si el organismo de prueba produce HSLs de 2 a 8 átomos de carbono en la cadena lateral (33) y una falta de pigmentación si no los produce.
8. Si no hay coloración, se incuban otras 24h a 30 °C y se vuelve a comprobar si se ha producido coloración.

## 4. Resultados y Discusión

### Detección de acil-HSLs en placa

A las 24 horas, la CV026 no presenta coloración violeta en ninguna de las placas (control negativo, control positivo y problema) tanto en agar LB como en TSB (Figura 2 y Figura 4, respectivamente).

A las 48 horas, la CV026 solo presenta coloración violeta en las placas de control positivo, tanto en agar LB como en TSB (Figura 3 y Figura 5, respectivamente).

### Detección de acil-HSLs en sobrenadante

A las 24 horas, solo el tubo de control positivo muestra una ligera coloración azulada (Figura 6), pudiendo observarse colonias de color violeta en el fondo del tubo (Figura 8).

A las 48 horas, solo se sigue observando cambio de coloración en el tubo de control (Figura 7).

### Detección de acil-HSLs en sobrenadante concentrado

A las 24 horas, no se observa cambio de coloración en ninguno de los tubos (Figura 9).

A las 48 horas, siguen sin observarse cambios de coloración en los tubos (Figura 10).

### Discusión

Los resultados obtenidos en el bioensayo en placa coinciden con los obtenidos por Singh (18) en los que no se observa coloración utilizando *C. violaceum* CV026, lo que indica bajos niveles de producción de Acil-HSLs de cadena corta. En cuanto al bioensayo con sobrenadante, tampoco se obtuvo coloración, pero difiere con los resultados obtenidos por Araújo (20) los cuales indican la presencia de Acil-HSLs de cadena corta. Esto puede ser debido a que ellos utilizaron una extracción con acetato de etilo de los cultivos en lugar de concentrar el sobrenadante.

También hay que aclarar las limitaciones del control positivo en el bioensayo en tubo, ya que la cepa de *C. violaceum* ATCC 12472 produce coloración violeta por sí misma lo que impide saber si la cepa de *C. violaceum* CV026 produce violaceína al estar en presencia de acil-HSLs de cadena corta.



Como posible mejora para este bioensayo, sería la utilización de otro biosensor como la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que permite la detección de Acil-HSLs de cadena larga (29), (18) mediante la producción de coloración azulada de forma muy similar al *C. violaceum* y así aumentar el espectro de detección del QS.

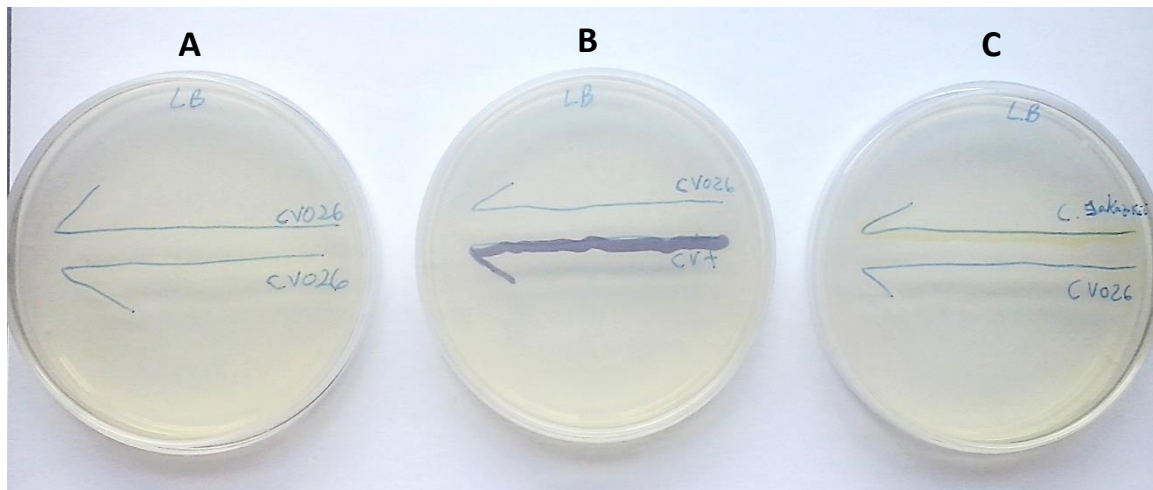


Fig. 2. Bioensayo en placa (LB) mostrando el indicador de HSL mediante la cepa indicadora *C. violaceum* CVO26 tras una incubación de 24 horas. (A) Control negativo; cepa CV026 sembrada contra sí misma. (B) Control positivo; cepa CV026 (superior) y cepa ATCC 12472 (inferior). (C) *C. sakazakii* (superior) y cepa CV026 (inferior).

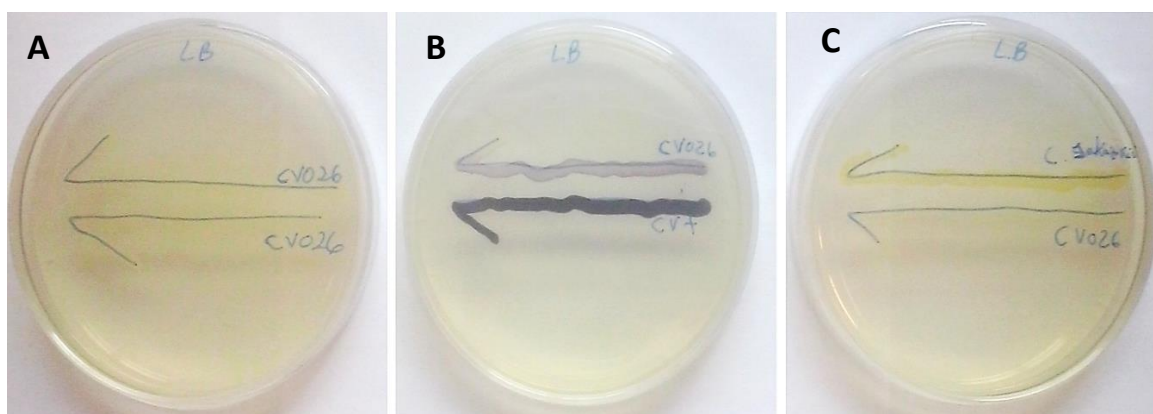


Fig. 3. Bioensayo en placa (LB) mostrando el indicador de HSL mediante la cepa indicadora *C. violaceum* CVO26 tras una incubación de 48 horas. (A) Control negativo; cepa CV026 sembrada contra sí misma. (B) Control positivo; cepa CV026 (superior) y cepa ATCC 12472 (inferior). (C) *C. sakazakii* (superior) y cepa CV026 (inferior).

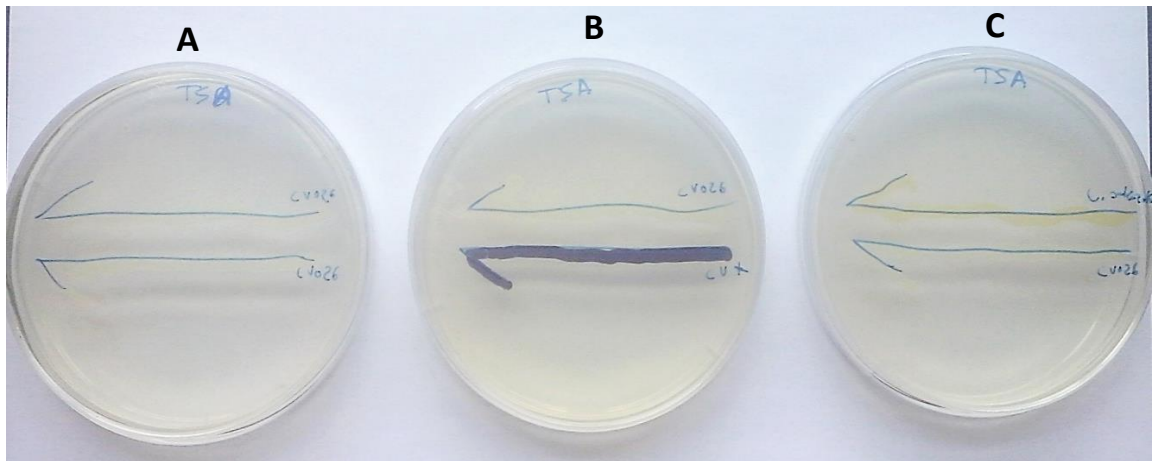


Fig. 4. Bioensayo en placa (TSA) mostrando el indicador de HSL mediante la cepa indicadora *C. violaceum* CVO26 tras una incubación de 24 horas. (A) Control negativo; cepa CV026 sembrada contra sí misma. (B) Control positivo; cepa CV026 (superior) y cepa ATCC 12472 (inferior). (C) *C. sakazakii* (superior) y cepa CV026 (inferior).

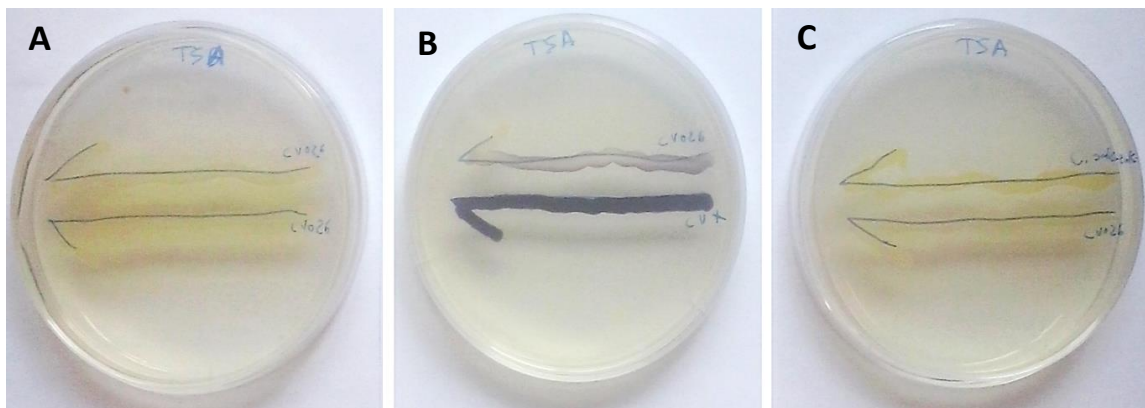


Fig. 5. Bioensayo en placa (TSA) mostrando el indicador de HSL mediante la cepa indicadora *C. violaceum* CVO26 tras una incubación de 48 horas. (A) Control negativo; cepa CV026 sembrada contra sí misma. (B) Control positivo; cepa CV026 (superior) y cepa ATCC 12472 (inferior). (C) *C. sakazakii* (superior) y cepa CV026 (inferior).

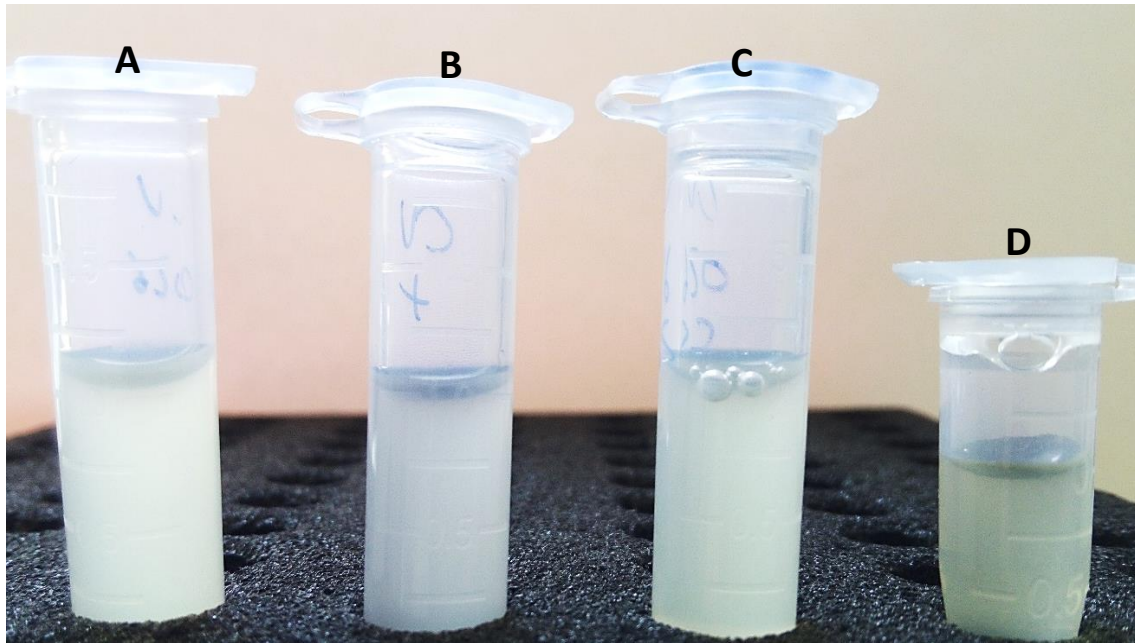


Fig. 6. Bioensayo con sobrenadante de *C. sakazakii* tras una incubación de 24 horas. (A) Control negativo; CV026 contra sí misma. (B) Control positivo; CV026 y ATCC 12472 (C) *C. sakazakii* y CV026 (1:9). (D) *C. sakazakii* y CV026 (9:1).

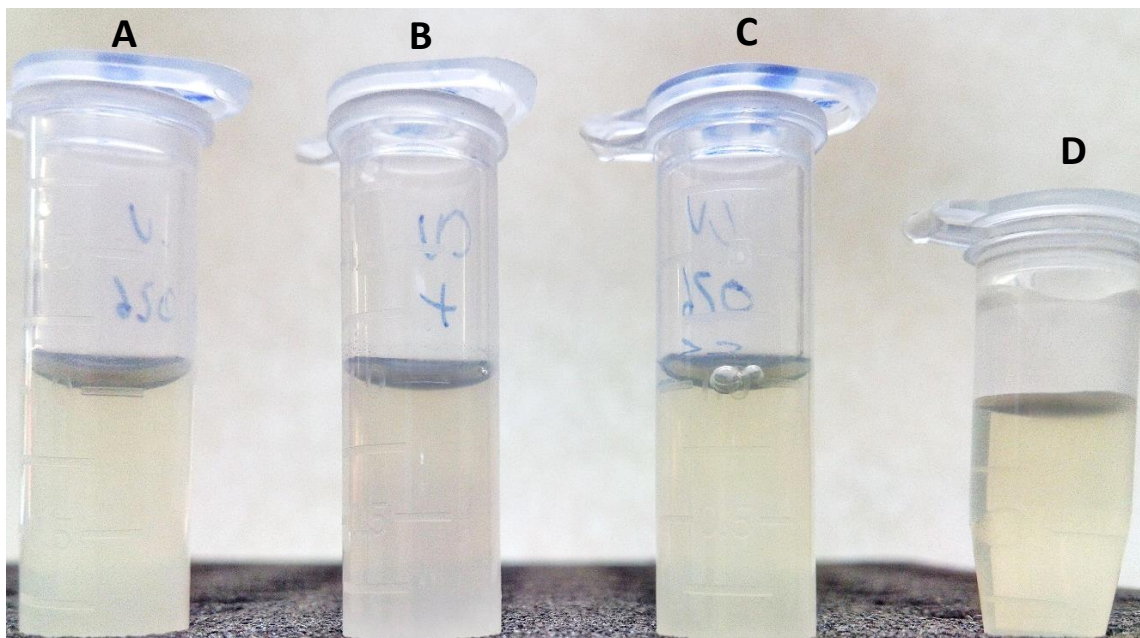


Fig. 7. Bioensayo con sobrenadante de *C. sakazakii* tras una incubación de 48 horas. (A) Control negativo; CV026 contra sí misma. (B) Control positivo; CV026 y ATCC 12472 (C) Sobrenadante y CV026 (1:9). (D) Sobrenadante y CV026 (9:1).



Fig. 8. Tubo de control positivo en bioensayo en sobrenadante de *C. sakazakii*, incubación de 24 horas. Se observan colonias de coloración violeta.

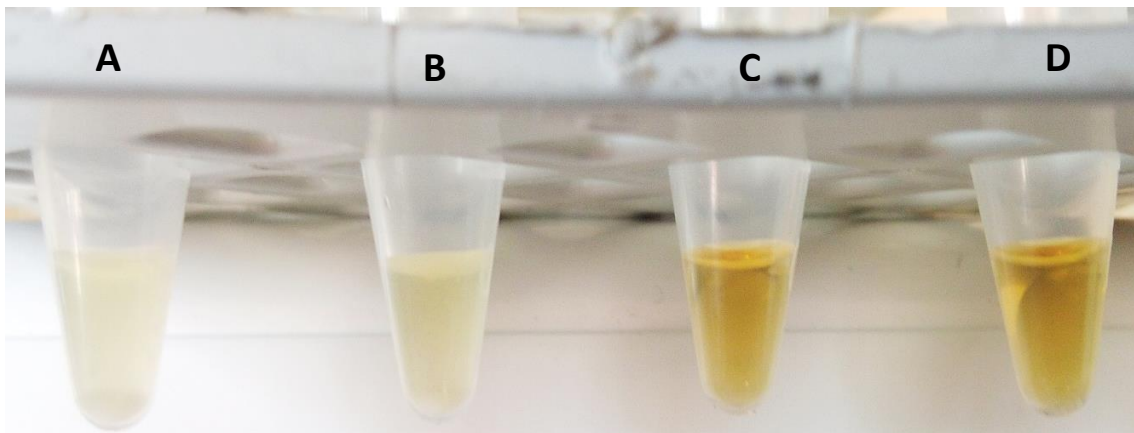


Fig. 9. Bioensayo con sobrenadante concentrado de *C. sakazakii* tras una incubación de 24 horas. (A) Sobrenadante concentrado y CV026 (1:9, LB). (B) Sobrenadante concentrado y CV026 (1:9, TSB). (C) Sobrenadante concentrado y CV026 (9:1, LB). (D) Sobrenadante concentrado y CV026 (9:1, TSB).

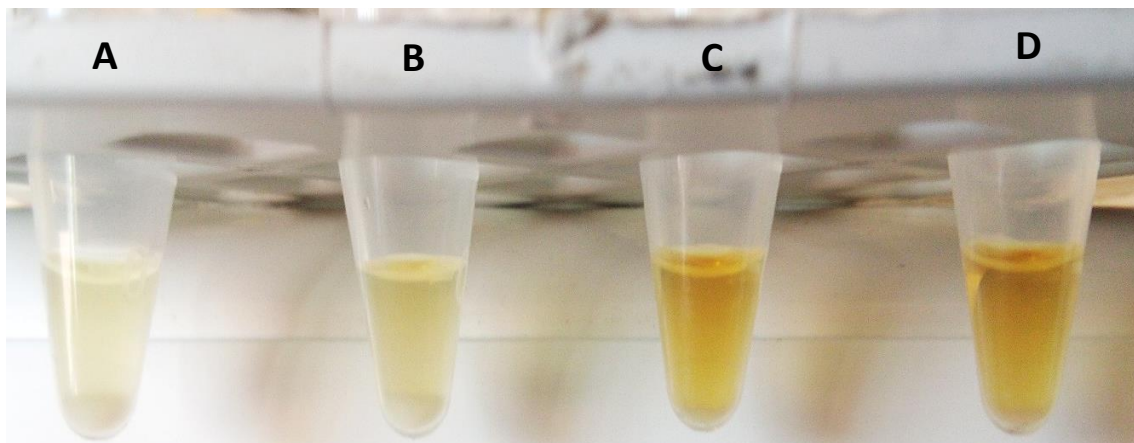


Fig. 10. Bioensayo con sobrenadante concentrado de *C. sakazakii* tras una incubación de 48 horas. (A) Sobrenadante concentrado y CV026 (1:9, LB). (B) Sobrenadante concentrado y CV026 (1:9, TSB). (C) Sobrenadante concentrado y CV026 (9:1, LB). (D) Sobrenadante concentrado y CV026 (9:1, TSB).

## 5. Conclusiones

- Se ha realizado con éxito la técnica del bioensayo con *C. violaceum* que permite la detección de Acil-HSLs implicados en el QS.
- Por los resultados obtenidos en el bioensayo, se concluye que la bacteria *C. sakazakii* ATCC 29544 (CECT 858) no produce Acil-HSLs de cadena corta o no los produce en suficiente cantidad como para ser detectados por *C. violaceum* CV026 cuando es sembrado en placa y tampoco cuando se utiliza su sobrenadante (tanto concentrado como sin concentrar).
- En cuanto a comprobar si existe diferencia en la detección de Acil-HSLs al utilizar medio TSB/TSA en lugar del LB, se puede concluir que no existe diferencia sustancial en la detección de Acil-HSLs en muestras sembradas en placas con estos medios, al menos, según los resultados obtenidos en las placas de control positivo.

## Bibliografía

1. March Rossello GA, Eiros Bouza JM. Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Med Clin (Barc)*. 2013; 141(8):353–357.
2. Swift S , Throup JP , Williams P , Salmond GP , Stewart GS. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci*. 1996;21:214–9.
3. Eberhard A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol*. 1972;109:1101–5.
4. Nealson KH. Autoinduction of bacterial luciferase: occurrence, mechanism and significance. *Arch. Microbiol*. 1977; 112:73-79.
5. Marquina D , Santos A. Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*. 2010; 3 (5): 39-55.
6. Eberhard A , Burlingame AL , Eberhard C , Kenyon GL , Nealson KH , Oppenheimer NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*. 1981, 20 (9), 2444–244.
7. Fuqua WC , Winans SC , Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 1994;176:269–75.

8. Diggle SP , Crusz SA , Cámara M. Quorum sensing. *Current Biology*. 2007; 17 (21): 907-910.
9. Winzer K , Hardie KR , Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now — gone to lunch! *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:216–22.
10. Hartmann A , Schikora A. Quorum Sensing of Bacteria and Trans-Kingdom Interactions of N-Acyl Homoserine Lactones with Eukaryotes. *J Chem Ecol*. 2012;38:704–13..
11. Eglund KA , Greenberg EP. Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*: Analysis of the LuxR DNA Binding Region by Alanine-Scanning Mutagenesis. *J Bacteriol*. 2001;183:382–6.
12. Bhargava N , Sharma P , Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36:349–60.
13. Kleerebezem M , Quadri LE , Kuipers OP , de Vos WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal- transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*. 1997;24:895–904.
14. Surette MG , Miller MB , Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1639–44.
15. Fuqua C , Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Sep;3(9):685-95.
16. Schertzer JW , Boulette ML , Whiteley M. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol*. 2009 17(5):189-95.
17. Iversen C , Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol*. 2003, 14, 443–454.
18. Singh N , Patil A , Prabhune A , Goel G. Inhibition of quorum-sensing-mediated biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* strains. *Microbiology*. 2016 Sep;162(9):1708-1714.
19. Kalyantanda G , Shumyak L , Archibald LK. *Cronobacter* Species Contamination of Powdered Infant Formula and the Implications for Neonatal Health. *Front Pediatr*. 2015; 3, 56.
20. Araújo FD , Esper LM , Kuaye AY , Sircili MP , Marsai AJ. N-Acyl-homoserine Lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and Their Degradation by *Bacillus cereus* Enzymes. *J Agric Food Chem*. Jan. 2012 Enero; 18;60(2):585-92.
21. Iversen, C , Forsythe, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food*. 2003, 14, 443–454..
22. Bowen AB , Braden CR. Invasive *Enterobacter sakazakii*. *Emerging Infect. Dis*. 2006, 12, 1185–1189.
23. Gurtler JB , Kornacki JL , Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *sakazakii: A coliform of increased concern to infant health*.

- 2005, 104, 1–34.
24. Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *J. Food. Prot.* 2005, 68, 2287–2294.
  25. Iversen C , Forsythe SJ. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Tech.* 2003; 14, 443–454.
  26. Pinto UM, Viana ES, Martins ML, Vanetti MCD. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control.* 2007, 18, 1322–1327..
  27. Waters C, Bassler B. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005 21, 319–346..
  28. Shrouf JD , Tolker-Nielsen T , Givskov M , Parsek MR. The contribution of cell–cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *MRS Bull.* 2011 36, 367–373.
  29. Chu W, Vattem D, Maitin V, Barnes MB, Mclean. Bioassays of Quorum Sensing Compounds Using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum*. In Rumbaugh P, editor. *Quorum Sensing Methods and Protocols.*: Humana Press; 2011. p. 315.
  30. Blosser R, Gray K. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Methods.* 2000; 40, 47-55.
  31. McClean KH , Winson MK , Fish L , Taylor A , Chhabra SR , Camara M , et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology.* 1997 Dec;143 ( Pt 12):3703-11.
  32. McLean RJ , Pierson LS , Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods.* 2004 Sep;58(3):351-60.
  33. Otero Casal AM. "Quorum sensing": La práctica de laboratorio. In "Quorum sensing": el lenguaje de las bacterias.: Editorial Acirbia; 2004. p. 140.
  34. Withers HL , Nordström K. Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; 22;95(26):15694-9.