

Comunicación celular *quorum sensing* y su interrupción en bacterias marinas patógenas

VICTORIA BÉJAR, ANA DEL MORAL, FERNANDO MARTÍNEZ-CHECA, INMACULADA SAMPEDRO, MARTA TORRES, JOSÉ CARLOS REINA, AMALIA ROCA, MIGUEL RODRÍGUEZ, INMACULADA LLAMAS

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. 18071. Granada.

Laboratorio de Microbiología. Instituto de Biotecnología. Centro de Investigación Biomédica. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada. 18016 Granada.

✉ illamas@ugr.es

El grupo de investigación Exopolisacáridos Microbianos BIO 188 (<https://www.bio188.es>) se creó en los años noventa siendo IP responsable Emilia Quesada y posteriormente, Victoria Béjar. Desde septiembre de 2022, el grupo lo dirige Inmaculada Llamas y está integrado por cinco profesores, un contratado Ramón y Cajal, un técnico de laboratorio y cuenta además con la colaboración de estudiantes de Grado y Máster, realizando TFG y TFM.

La investigación de nuestro grupo se ha enfocado desde sus inicios al estudio de bacterias halófilas, concretamente aspectos relativos a la taxonomía y biodiversidad de ambientes salinos, genética, producción de exopolisacáridos y sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. En el año 2005 comenzamos los estudios de comunicación bacteriana tipo **quorum sensing (QS)**, y describimos por primera vez la existencia de un sistema QS que dependía de moléculas *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) en bacterias halófilas del género *Halomonas*. En 2009, describimos la presencia de estos sistemas en bacterias marinas patógenas de peces y moluscos pertenecientes al género *Vibrio*. Así, se caracterizaron las moléculas señal tipo AHLs producidas por cepas virulentas pertenecientes a las especies *V. mediterranei*, *V. coralliilyticus* y *V. owensii*. Se demostró asimismo su papel regulador sobre funciones celulares tales como la movilidad y la producción de enzimas hidrolíticas, muchas de ellas consideradas factores de virulencia. Estos resultados se confirmaron en los ensayos de virulencia *in vivo* en almejas infectadas con mutantes afectados en la síntesis de AHLs.

En los últimos años, parte de nuestra investigación se ha orientado al desarrollo



Miembros del grupo BIO 188 de la UGR. Foto superior: Inmaculada Sampedro, Ana del Moral, Inmaculada Llamas, Victoria Béjar, Fernando Martínez-Checa y Amalia Roca. Foto inferior: Marta Torres y José Carlos Reina.

y explotación de las aplicaciones biotecnológicas de las bacterias que inhiben la comunicación celular de bacterias patógenas como una nueva alternativa de lucha contra las enfermedades que merman la acuicultura y agricultura. En relación con la acuicultura, actualmente contamos con 20 bacterias marinas con demostrada capacidad de interrumpir la comunicación celular, y con ello, la expresión de factores de virulencia. Un grupo de estas bacterias es capaz de hidrolizar enzimáticamente, mediante acilasas o lactonasas, un amplio rango de moléculas AHLs, estrategia conocida como **quorum quenching (QQ)**. Estas bacterias proceden de criaderos de bivalvos situados en Lugo y Granada y de la microbiota de anémonas y holoturias que

la empresa iMARE (Motril, Granada) cultiva para su exportación. Pertenecen a los géneros *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Ruegeria*, *Microbulbifer* y *Rheinheimeria* y han sido ensayadas en cocultivo con las especies patógenas del género *Vibrio*, demostrando la capacidad de degradación de las AHLs y la reducción de algunos factores de virulencia, sin afectar a su crecimiento. En base a estos resultados, se han llevado a cabo ensayos de virulencia *in vivo* en cultivos larvarios de almejas infectados con *V. tubiashii*; en el coral *Oculina patagonica* infectado con *V. mediterranei* y en *Artemia salina* infectada con *V. coralliilyticus*, demostrándose que la virulencia de los patógenos disminuye de forma signi-

ficativa en presencia de las bacterias QQ. Siguiendo un enfoque molecular, se ha identificado y caracterizado una nueva enzima QQ, no descrita anteriormente, con actividad lactonasa HqiA a partir de una librería metagenómica de una muestra de suelo de un ambiente hipersalino en Murcia. La expresión de dicha enzima en especies patógenas de *Vibrio*, entre otras, produjo la disminución de la expresión de factores de virulencia regulados por QS. Dada la importancia de los mecanismos de degradación de tipo QQ, también se ha realizado el análisis bioinformático de diferentes metagenomas de libre acceso para determinar la abundancia de las enzimas QQ en numerosos ambientes de orígenes muy diversos. Se ha demostrado la abundancia de las enzimas QQ en los mismos, confirmando además que las lactonasa suelen ser más abundantes que las acilasa, si bien por técnicas clásicas se suelen identificar más acilasas.

Otra de las estrategias para la interrupción de los sistemas QS es la producción de moléculas análogas a las AHLs o **quorum sensing inhibitors (QSI)** que compiten con el receptor e impiden la activación del mismo. En este sentido, a partir de la misma colección de bacterias marinas anteriormente mencionada, hemos seleccionado una cepa perteneciente a *V. alginolyticus* que produce tiramina y N-acetiltiramina responsables de la actividad QSI y reduce factores de virulencia como la movilidad y la síntesis de pioverdina en *Pseudomonas aeruginosa*. Estos resultados vienen a confirmar el enorme **potencial biotecnológico** de las bacterias de ambientes salinos.

Para su financiación, el grupo ha contado de forma ininterrumpida con varios proyectos del Ministerio, Junta de Andalucía, Universidad de Granada, así como ayudas a grupos de investigación. Actualmente desarrollamos dos proyectos, uno de ellos orientado a la acuicultura financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-106704RB-100) y otro basado en la misma estrategia *quorum quenching*, orientado a la agricultura subvencionado por el Programa Operativo FEDER (B-AGR-222-UGR20). Esta financiación ha permitido formar a una veintena de doctores, algunos de los cuales continúan su carrera profesional en la Universidad, mientras que otros ocupan puestos relevantes a nivel nacional y fuera de España. Dos de ellos, Marta Torres, becaria posdoctoral Marie Curie (Zurich) y José Carlos Reina, que se está preparando para ser Farmacéutico Titular

del Estado, han contribuido de manera relevante en los logros científicos de nuestro grupo en el área de la acuicultura.

En cuanto a la actividad de transferencia de la investigación, algunos miembros del grupo BIO-188 impulsaron, junto a profesionales de otros campos, la creación en 2013 de la *spin-off* Xtrem Biotech S.L. (www.xtrembiotech.com), con la que colaboran mediante asesoramiento científico para dar salida al potencial de los microorganismos extremófilos. Además, el grupo ha desarrollado 3 patentes nacionales y 2 internacionales. Una de ellas está en explotación por Xtrem Biotech S.L. y genera royalties a la Universidad de Granada desde 2017 (EP3178325A1). Asimismo, a través de varios contratos de transferencia de resultados, dos de los exopolisacáridos producidos por bacterias halófilas de nuestra colección han sido patentados por la empresa Lipotec-Lubrizol, la cual los comercializa como los cosméticos CELLYNKAGE™ y NOCTURSHAPE™. Estas patentes igualmente generan royalties a la Universidad de Granada desde 2015.

Nuestro grupo colabora con investigadores de diferentes centros, universidades y empresas, tanto nacionales como internacionales (véase página web del grupo <https://www.bio188.es>) y forma parte de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos desde su fundación a principios de los noventa.

Publicaciones seleccionadas

Reina JC, Pérez P y Llamas, I. (2022). Quorum quenching strains isolated from the microbiota of sea anemones and holothurians attenuate *Vibrio corallilyticus* virulence factors and reduce mortality in *Artemia salina*. *Microorganisms* 10: 631. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030631>

Reina JC, Romero M, Salto R, Cámara M y Llamas I. (2021). AhaP, a quorum quenching acylase from *Psychrobacter* sp. M9-54-1 that attenuates *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio corallilyticus* virulence. *Mar Drugs* 19: 16. <https://doi.org/10.3390/md19010016>

Reina JC, Pérez-Victoria I, Martín J y Llamas I. (2019). A quorum-sensing inhibitor strain of *Vibrio alginolyticus* blocks QS-controlled phenotypes

in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Mar Drugs* 17: 494. <https://doi.org/10.3390/md17090494>

Reina JC, Torres M y Llamas M. (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* AHL-degrading strains isolated from marine invertebrate microbiota attenuate the virulence of *Pectobacterium* and *Vibrio corallilyticus*. *Mar Biotechnol* 21: 276-290. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09878-w>

Torres M, Dessaux Y y Llamas I. (2019). Saline environments as a source of potential quorum sensing disruptors to control bacterial infections: a review. *Mar Drugs* 17: 191 (<https://doi.org/10.3390/MD17030191>).

Torres M, Reina JC, Fuentes-Monteverde JC, Fernandez G, Rodriguez J, Jimenez C y Llamas I. (2018). AHL-lactonase expression in three marine emerging pathogenic *Vibrio* spp. reduces virulence and mortality in brine shrimp (*Artemia salina*) and manila clam (*Venerupis philippinarum*). *PLoS ONE* 13: e0195176.

Torres M, Hong K-W, Chong T-M, Reina JC, Chan K-G, Dessaux Y y Llamas I. (2018). Genome analyses of two *Alteromonas stellipolaris* strains reveal different traits with potential biotechnological applications. *Sci Rep* 9: 1215. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37720-2>

Torres M, Uroz S, Salto R, Fauchery L, Quesada E y Llamas I. (2017). HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. *Sci Rep* 7: 943. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01176-7>

Torres M, Rubio Portillo E, Antón J, Ramos-Esplá AA, Quesada E y Llamas I. (2016). Selection of the N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and its potential for biocontrol in aquaculture. *Front Microbiol* 7:1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00646>

Torres M, Romero M, Prado S, Dubert J, Tahrioui A, Otero A y Llamas I. (2013). N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures. *Microbiol Res* 66: 297-311. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.04.011>