

**CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA ACIL HOMOSERINA LACTONASA DE
UNA CEPA DE *Bacillus thuringiensis***

CARMEN JULIA PEDROZA PADILLA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO DE BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN
2010**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA ACIL HOMOSERINA LACTONASA DE
UNA CEPA DE *Bacillus thuringiensis***

CARMEN JULIA PEDROZA PADILLA

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias - Biotecnología

**DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN
SERGIO ORDUZ PERALTA M.Sc., Ph.D**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO DE BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN
2010**

Nota de aceptación

Firma del presidente del Jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, 2010

Al único Dios, Jesús, porque me amó primero

A mis padres, por su amor y dedicación

A mi esposo, por su compañía

A Samuel, por llegar y cambiar mi vida

AGRADECIMIENTOS

A Sergio Orduz Peralta M.Sc., Ph.D., por creer en mi y haberme brindado la oportunidad de conocer, aprender y servir a la ciencia. Por todos los conocimientos transmitidos.

A Orlando Simon Ruiz Ph.D., por todas y cada una de sus valiosas y siempre oportunas asesorías en enzimología, porque por su apoyo todo se hizo mucho más fácil.

A Carlos Uribe, Técnico Químico de la SIU, por su valiosa ayuda en cromatografía.

A Milton Martínez, por su siempre oportuna ayuda con los análisis estadísticos.

A los doctores Cesar Segura y Carlos López de la UdeA, por sus asesorías en cromatografía.

A la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas por ser mi escuela y segundo hogar.

A todos los amigos e investigadores de control biológico y demás compañeros de la CIB por su colaboración y apoyo.

A COLCIENCIAS y a la CIB por financiar este proyecto de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	16
5. MARCO TEÓRICO	17
5.1 Quorum sensing	17
5.1.1 Mecanismos generales de quorum sensing	19
5.2 Quorum quenching o inhibición de la comunicación celular	22
5.2.1 AHL-lactonasa	24
5.2.2 AHL-Acilasas	27
5.2.3 Paraoxonasas	28
5.3 Aplicaciones de quórum quenching.	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo	32
6.2 Fase I. Determinación de condiciones generales de la AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ del gen <i>aiiA</i> de <i>B. thuringiensis</i>	33
6.2.1 Detección de actividad biológica de la enzima purificada	33
6.2.2 Determinación del efecto de la temperatura, estabilidad térmica y pH en la actividad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	33
6.2.2.1 Efecto de la temperatura	33
6.2.2.2 Estabilidad térmica	34
6.2.2.3 Efecto del pH	34
6.2.3 Efecto de iones y agente quelante en la AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	34
6.3 Fase II. Cuantificación y caracterización de la actividad AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ del gen <i>aiiA</i> de <i>B. thuringiensis</i>	35
6.3.1 Evaluación de la actividad de hidrólisis de AHL por la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	35
6.3.2 Extracción y cuantificación de AHLs por HPLC-MS	35

6.3.3 Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	36
6.3.4 Evaluación de la estabilidad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ a diferentes pH	37
6.3.5 Efecto iones metálicos divalentes y de agentes quelantes en la actividad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	37
6.3.6 Cinética y especificidad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	38
6.4 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Fase I. Determinación de condiciones generales de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ del gen <i>aiiA</i> de <i>B. thuringiensis</i>	39
7.1.1 Detección de actividad biológica de la enzima purificada	39
7.1.2 Determinación del efecto de temperatura, condiciones de estabilidad térmica y pH en la actividad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ .	40
7.1.3 Efecto de iones y del agente quelante en la actividad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	42
7.2 Fase II. Cuantificación y caracterización de la actividad AHL-lactonasa del gen <i>aiiA</i> de la cepa <i>B. thuringiensis</i>₁₄₇₋₁₁₅₁₆	43
7.2.1 Evaluación de la actividad de hidrólisis de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante	43
7.2.3 Extracción y cuantificación de AHLs por HPLC-MS	43
7.2.4 Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima recombinante	51
7.2.5 Evaluación de la estabilidad de la enzima recombinante a diferentes pH	51
7.2.6 Efecto de los iones metálicos y del agente quelante en la actividad de AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	52
7.2.7 Cinética y especificidad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante	54
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
9. CONCLUSIONES	62
10. RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Señales microbianas de QS	17
Figura 2. Mecanismos generales de quorum sensing microbiano	18
Figura 3. Modelo de interferencia de mecanismo de QS dependiente de AHL	22
Figura 4. Estructura general de AHL y actividad AHL-lactonasa	23
Figura 5. Mecanismo catalítico para AiiA _{BTK}	26
Figura 6. Estructura general de AHL y actividad AHL-acilasa	26
Figura 7. Evaluación de la actividad AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ con cepas reporteras	38
Figura 8. Evaluación de estabilidad térmica en la actividad AHL-lactonasa	40
Figura 9. Efecto de iones en la actividad de la enzima AHL-lactonasa	41
Figura 10. Efecto de agente quelante en la actividad de la enzima	41
Figura 11. Hidrólisis de AHL por actividad AHL-lactonasa	43
Figura 12. Cromatograma de N-butanoil y hexanoil homoserina lactona	44
Figura 13. Cromatograma de N-heptanoil y octanoil homoserina lactona	45
Figura 14. Espectro de masas ESI-MS de N-butanoil homoserina lactona	46
Figura 15. Espectro de masas ESI-MS de N-hexanoil homoserina lactona	47
Figura 16. Espectro de masas ESI-MS de N-heptanoil homoserina lactona	48
Figura 17. Espectro de masas ESI-MS de N-octanoil homoserina lactona	49
Figura 18. Evaluación de la estabilidad térmica de la AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	50
Figura 19. Efecto del pH en la actividad AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante	51
Figura 20. Efecto de los iones en la actividad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁	52
Figura 21. Especificidad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ por el sustrato	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas de quorum quenching en procariotas y eucariotas	24
Tabla 2. Condiciones de optimización de ESI.MS para la cuantificación de AHL	35
Tabla 3. Efecto de la temperatura y evaluación de la estabilidad térmica de la enzima en presencia de C6-HSL y la cepa reportera CV026	39
Tabla 4. Efecto del pH en la actividad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ en presencia de C6-HSL evaluados con la cepa reportera CV026	40
Tabla 5. Iones seleccionados para cuantificar la actividad residual de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ sobre N-acil homoserina lactonas	43
Tabla 6. Comparaciones estadísticas del efecto de iones y del agente quelante EDTA en la actividad de la enzima AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante	52
Tabla 7. Comparaciones estadísticas del efecto de iones en la actividad AHL-lactonasa	53
Tabla 8. Parámetros cinéticos de AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante usando AHLs de diferentes longitudes de cadena acilo	54
Tabla 9. Comparaciones estadísticas de sustratos con diferentes longitudes de cadena acilo en la actividad AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico del efecto de iones y agente quelante en la actividad AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆	69
Anexo 2. Análisis estadístico de especificidad de la AHL-lactonasa ₁₄₇₋₁₁₅₁₆ por el sustrato.	75

ABSTRACT

The signals of N-acyl homoserine lactones, and inducing small diffusible molecules, are part of the key components of bacterial communication systems known as quorum sensing, this mechanism can lead to expression of virulence genes can be interrupted with the participation of enzyme encoded by the gene *aiiA* of a strain of *Bacillus thuringiensis* to inactivate signaling molecules by hydrolysis. The characterization was performed using the recombinant AHL-lactonase, which showed biological activity in alkaline pH conditions and high temperatures, as well as act on substrates with acyl chain of different sizes. But the functionality of the recombinant enzyme decreased by the action of metal ions but not by the effect of chelating agents. The affinity of the enzyme with all substrates tested, and their behavior in the evaluated conditions allow us to infer that the AHL-lactonase of strain *B. thuringiensis*_{147-11 516} can be used as a strategy of interruption in the communication of plant pathogenic bacteria.

Keywords: Quorum sensing, quorum quenching, AHL-lactonase, N-acyl homoserine lactone.

RESUMEN

Las señales de N-acil homoserina lactonas, pequeñas moléculas difusibles e inductoras, constituyen parte de los componentes claves del sistema de comunicación bacteriana conocido como quorum sensing, este mecanismo que puede llevar a la expresión de genes de virulencia puede interrumpirse con la participación de una enzima codificada por el gen *aiiA* de una cepa de *Bacillus thuringiensis* que inactiva las moléculas de señal mediante la hidrólisis. La caracterización se realizó a partir de la AHL-lactonasa recombinante, la cual mostró actividad biológica en condiciones de pH alcalino y a altas temperaturas, así como también actuó sobre sustratos con cadena acilo de diferentes tamaños. Pero la funcionalidad de la enzima recombinante disminuyó por la acción de iones metálicos más no por el efecto de agentes quelantes. La afinidad de la enzima con todos los sustratos probados y su comportamiento en las condiciones evaluadas permiten inferir que la AHL-lactonasa de la cepa *B. thuringiensis*₁₄₇₋₁₁₅₁₆ puede usarse como estrategia de interrupción en la comunicación de bacterias patógenas para plantas.

Palabras Claves: Quorum sensing, quorum quenching, AHL-lactonasa, N-acil homoserina lactona.

INTRODUCCIÓN

Quórum sensing (QS) en bacterias, se refiere a la habilidad de una sola célula para sentir y responder a una alta densidad poblacional (Lazazzera et al., 1997). Las N-acil homoserina lactonas (AHLs), también conocidas como autoinductores, son moléculas de señalización celular que están presentes en el sistema de comunicación QS de muchos microorganismos. La bacteria libera, detecta y responde a la acumulación de estas moléculas dando como resultado la regulación de la expresión de genes y una respuesta coordinada a nivel de la comunidad microbiana (Dong et al., 2002). Pero esta comunicación bacteriana puede contrarrestarse mediante un mecanismo de interrupción de la señalización llamado quorum quenching, dentro de las estrategias anti QS existe una facilitada por enzimas, entre ellas la AHL-lactonasa codificada por el gen *aiiA*, que es responsable de la degradación de las moléculas de señalización AHL de patógenos Gram negativos causando una hidrólisis en el anillo de lactona de la molécula (Dong et al., 2001, 2002; Lee et al., 2002). Estos recientes descubrimientos indujeron al desarrollo de experimentos de varios grupos de investigación y del nuestro que demostraron que el producto del gen *aiiA* de *Bacillus thuringiensis* causa la inactivación del autoinductor AHL, inhibiendo la virulencia del fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum* (antes *Erwinia carotovora*) (Dong et al., 2000, 2004).

Los efectivos y visibles resultados de los bioensayos de la actividad AHL-lactonasa de una cepa de *B. thuringiensis* contra patógenos de plantas y que además es tóxica para lepidópteros indican la importancia de la caracterización bioquímica completa de esta enzima que puede ser usada en el futuro como controlador biológico. En este estudio describiremos el comportamiento de la AHL-lactonasa recombinante del gen *aiiA* de una cepa de *B. thuringiensis* frente a varias condiciones de pH, ensayos de estabilidad térmica, iones divalentes, además de la evaluar la especificidad y la cinética de la AHL-lactonasa.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Como resultado del proyecto “Identificación y caracterización de N-Acil Homoserina Lactonasas en cepas de *Bacillus thuringiensis*” financiado por Colciencias, se encontraron cepas de *B. thuringiensis* con capacidad AHL-lactonasa que presentaron una alta efectividad inhibiendo la patogenicidad de bacterias patógenas de plantas. De esta manera se identificó otro de los potenciales que tiene *B. thuringiensis*, además de su capacidad insecticida. De acuerdo a estos resultados, la AHL-lactonasa parece ser una enzima potente que posee actividad frente a un amplio rango de AHLs, tanto así, que ha despertado la curiosidad de los investigadores por conocer a profundidad la cinética y especificidad de esta enzima. Hasta el momento sólo se ha caracterizado bioquímicamente una AHL-lactonasa codificada por genes homólogos *aiiA*, purificada de *Bacillus* sp. 240, que se trata de una enzima que presenta un motivo catalítico $^{106}\text{HXDH}^{109}\sim\text{H}^{169}$ que no requiere de la unión de zinc ni de cualquier otro metal para su actividad (Wang et al., 2004). De acuerdo a estos estudios, surge la necesidad de caracterizar las propiedades de la AHL-lactonasa producida a partir de un aislamiento nativo de *B. thuringiensis* (con actividad insecticida) cepa 147-11516. De esta cepa se conoce su actividad de AHL-lactonasa utilizando cepas reporteras sensibles a AHLs (*Chromobacterium violaceum* CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4) y mediante bioensayos interactuando con fitopatógenos en tejido vegetal donde se observó la disminución de los síntomas.

Adicionalmente, esta cepa es tóxica contra lepidópteros y sus genes *cry* ya han sido caracterizados, así como su perfil de proteínas Cry ya ha sido evaluado por electroforesis de poliacrilamida. De esta manera, con este proyecto se obtendría la caracterización más completa de una cepa de *B. thuringiensis* con potencial para controlar fitopatógenos, además de su capacidad insecticida. Así mismo, se obtendría el conocimiento previo para producir la enzima como un producto adicional a los cristales y esporas involucrados en la toxicidad contra insectos.

3. JUSTIFICACIÓN

El incontenible aumento de la población mundial así como también la necesidad de suplir sus necesidades básicas (alimentación y salud) hacen cada vez más notoria la pobreza de millones de personas malnutridas en el mundo, la cual asciende a 1.020 millones, con un incremento estimado de 105 millones de hambrientos en el 2009. Estas carencias con causas múltiples, entre ellas la reciente y creciente demanda de alimentos para biocombustibles, además de la actual crisis económica mundial (FAO, 2009), requiere soluciones sostenibles que incrementen la actividad agrícola y disminuyan el efecto negativo causado por el uso de agroquímicos y pesticidas que han afectado continuamente el ecosistema y la salud humana. Del mismo modo, es importante el desarrollo de medicamentos que no impongan la presión de selección “vida o muerte” para que disminuya la aparición de bacterias multirresistentes que actualmente causan enormes pérdidas humanas en especial a pacientes con el sistema inmunológico comprometido.

El quorum quenching se plantea como una alternativa prometedora aplicable en múltiples áreas (agricultura, acuicultura y medicina) ya que los microorganismos que producen la interrupción de la comunicación celular están ampliamente distribuidos en la naturaleza y algunos de ellos como la bacteria *B. thuringiensis* que produce la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ estudiada en esta investigación ya son usados como controladores biológicos o bioinsecticidas, que si son empleados de manera responsable podrían reducir las pérdidas causadas por las plagas en los cultivos y minimizar los daños ambientales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar la enzima AHL-lactonasa de una cepa de *B. thuringiensis*.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Evaluar la actividad hidrolítica de la enzima AHL-lactonasa de una cepa de *B. thuringiensis*.
- 4.2.2 Evaluar las propiedades enzimáticas de la enzima AHL-lactonasa mediante pruebas de estabilidad térmica y a diferentes pH.
- 4.2.3 Determinar el efecto de iones metálicos divalentes y agentes quelantes en la actividad de la enzima AHL-lactonasa.
- 4.2.4 Evaluar la cinética y especificidad de la enzima AHL-lactonasa.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Quorum sensing

Muchos organismos para colonizar e infectar su huésped, dependen y usan el sistema de quórum sensing (QS) o sensación de quórum, descubierto inicialmente en la bacteria marina *Vibrio fischeri* en 1970, quien lo utiliza para regular la expresión de bioluminiscencia (Nealson et al., 1970). El QS bacteriano es una estrategia de comunicación célula a célula que le permite liberar y detectar pequeñas moléculas de señal que se acumulan a medida que aumenta la densidad poblacional y así, poder responder de forma individual y colectiva a cambios ambientales, además de coordinar sincronizadamente la expresión de algunos genes; por ejemplo, aparte de de la regulación de la bioluminiscencia en *V. fischeri* y *V. harvey*, se ha descubierto que este tipo de moléculas intervienen en la regulación de otros procesos biológicos en muchos organismos, entre ellos, el intercambio genético en la conjugación de *Enterobacter faecalis*, expresión de factores de virulencia y formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa*, desarrollo de competencia genética y diferenciación de esporas en *Bacillus subtilis*, desarrollo de cuerpos fructíferos por *Myxococcus xanthus*, producción de antibióticos por *Streptomyces* sp. y también, son secretadas por varias Proteobacterias (Miller y Bassler, 2001; Lazazzera y Grossman, 1998; Lazazzera, 2000; Lin et al., 2003; Qin et al., 2007). El fenómeno de QS no sólo está limitado al reino procariota; hongos patógenos unicelulares también usan señales de QS para coordinar funciones biológicas. Recientemente se ha reportado que el patógeno fúngico *Candida albicans* produce ácido farsenoico (FA) para regular la transición de levadura a micelio, que es importante para la virulencia del hongo (Oh et al., 2001; Hornby et al., 2001; Dong y Zhang, 2005).

En las últimas dos décadas se han descubierto pequeñas moléculas de señal que van desde derivados de ácidos grasos, oligopéptidos, furanonas, acilhomoserina lactonas (AHL), tiolactona cíclica (AIP), éster metílico del ácido palmítico (PAME), furanosylborato (AI-2), methyl dodecenoic acid (DSF), entre otras más (figura 1), muchas de las cuales están

vinculadas en la regulación de virulencia bacteriana (Dong y Zhang, 2005; Dong et al., 2007).

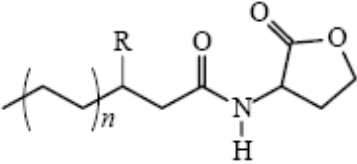
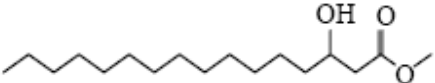
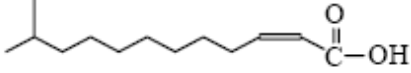
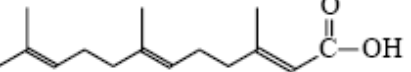
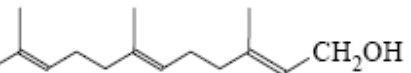
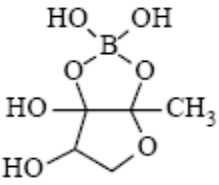
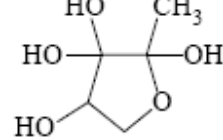
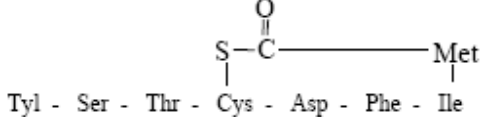
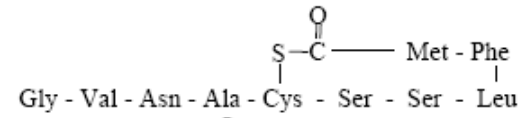
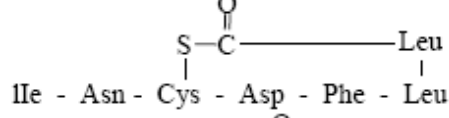
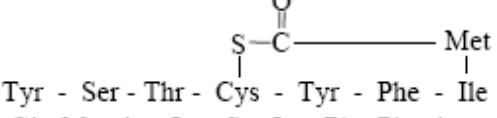
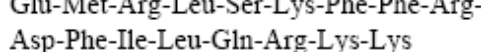
Sistema QS	Estructura de la señal	Organismos representativos
AHLs		<i>Vibrio fischeri</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>
PAME		
DSF		<i>Xanthomonas campestris</i>
Ácido farsenoico		<i>Candida albicans</i>
Farsenol		<i>Candida albicans</i>
AI-2 (S-THMF-borato)		<i>Vibrio harveyi</i>
AI-2 (R-THMF)		<i>Salmonella typhimurium</i>
AIP-I		<i>Staphylococcus aureus</i> cepas grupo I
AIP-II		<i>Staphylococcus aureus</i> cepas grupo II
AIP-III		<i>Staphylococcus aureus</i> cepas grupo III
AIP-IV		<i>Staphylococcus aureus</i> cepas grupo IV
CSP		<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Figura 1. Señales microbianas de QS. Tomado de Dong et al. (2007).

5.1.1 Mecanismos generales de quorum sensing

Existen diferentes tipos de señales de QS en bacterias y levaduras (figura 1), pero ellas parecen adoptar solamente dos mecanismos generales para la detección y respuesta a estas señales. Un mecanismo general en bacterias Gram negativas es el sistema QS dependiente de acil-homoserina lactonas (AHL), en el cual la señal de QS se detecta por un factor de transcripción citosólico (R); brevemente, la proteína I (AHL sintasa) produce moléculas de AHL que son difusibles a través de la membrana celular y a medida que alcanzan una concentración crítica extracelular, ingresan nuevamente a la célula y se unen a la proteína R, formando el complejo R-AHL, que activa la expresión de algunos genes (figura 2A). En el otro mecanismo, sistema de dos componentes, la señal de QS es un péptido (PS) producido por bacterias gram positivas como *S. aureus* y *S. pneumoniae* que se detecta por un sistema regulador de respuesta de dos componentes asociados a la membrana (figura B). La mayoría de las bacterias parecen usar uno u otro de los dos sistemas en la expresión de genes, pero también hay agentes patógenos que establecen los dos mecanismos de QS para el mismo propósito; por ejemplo, *V. harvey* (Waters y Bassler, 2005; Dong et al., 2007).

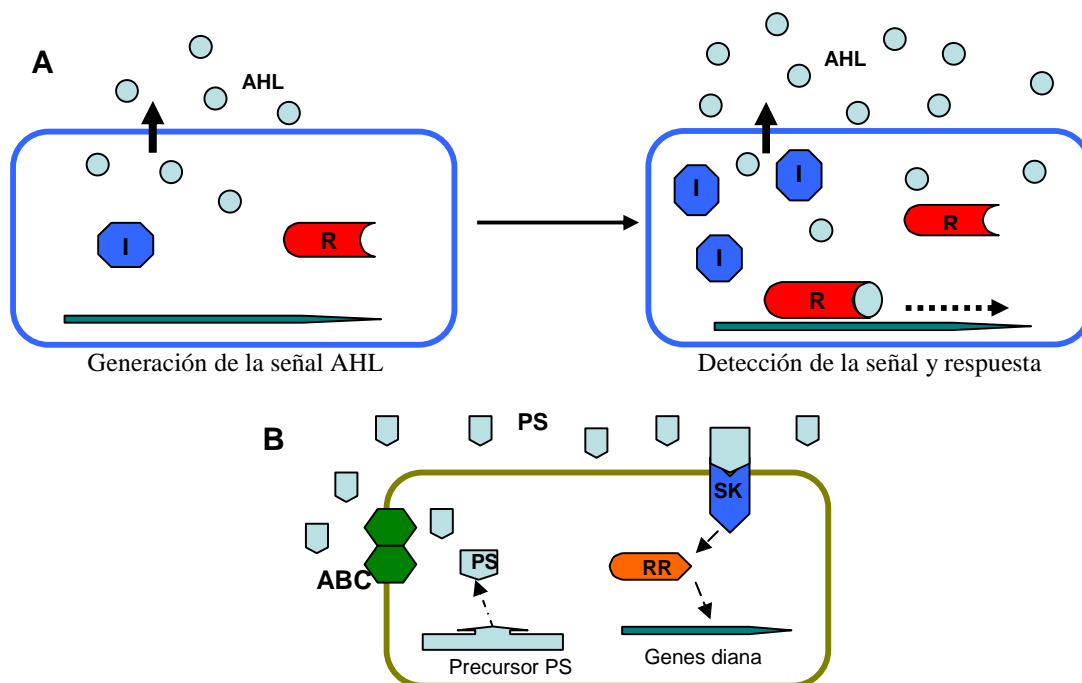


Figura 2. Mecanismos generales de quorum sensing microbiano. (A) QS mediado por AHL. (B) QS mediado por un péptido (sistema de dos componentes); Mirar detalle en el texto.

El QS mediado por AHL es uno de los mecanismos de comunicación célula a célula mejor caracterizados. Se conocen unas 70 especies bacterianas que producen señales de QS tipo AHL (Williams et al., 2007). Entre ellas se encuentran, bacterias gram negativas asociadas a plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *P. chrysanthemi*, *P. stewarti*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium etli*, *Xanthomonas campestris*, *Chromobacterium violaceum* entre otras y algunas de importancia clínica como *P. aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, *Yersinia pseudotuberculosis* y especies de *Burkholderia*. El sistema de QS tipo AHL puede dividirse en varios pasos claves: (I) generación de señal a un nivel basal, (II) acumulación de la señal, (III) recepción de la señal, (IV) autoinducción de la señal y activación de genes blanco y (V) descenso de la señal. Mientras los pasos del I al IV parecen ser las características más o menos conservadas (Whitehead et al., 2001), el paso (V) sólo se ha reportado en *A. tumefaciens* (Zhang et al., 2002; Zhang et al., 2004; Dong et al., 2007).

En el paso (I), la densidad de la población bacteriana es baja y cada célula produce un nivel basal de AHL. Las moléculas de AHL son sintetizadas por la AHL sintasa (proteína-I) codificada por el gen homólogo *luxI*, usando cadenas acilo correspondientes derivadas de la ruta de biosíntesis común de ácidos grasos y S-adenosilmetionina (SAM) (Moré et al., 1996; Schaefer et al., 1996). En esta etapa no se requiere el factor de transcripción (proteína-R) tipo LuxR. En el paso (II), las señales de cadena corta de AHL son capaces de difundirse pasivamente a través de la membrana celular (Dong et al., 2005), mientras la salida de señales de AHL de cadena larga parece basarse en un mecanismo de transporte activo (Pearson et al., 1999; Dong et al., 2005). La bomba de salida múltiple MexAB-OprM está involucrada en el transporte activo de la señal 3-oxo-dodecanoil homoserina lactona en *P. aeruginosa* (Pearson et al., 1999), así mismo, Aendekerk et al. (2002) reportaron que una mutación de la bomba de salida MexGHI-OpmD en *P. aeruginosa* redujo drásticamente la producción de señales de AHL y de factores de virulencia. En el paso (III), la proteína-R se une a las señales de AHL en el citosol, incluso hay reportes que explican que esta unión prolonga la vida media del factor de transcripción de unos pocos minutos, hasta más de 30 minutos (Zhu y Winans, 1999). Además, dado que la salida de señales de AHL de cadena larga requiere transporte activo, parece lógico que un sistema de flujo activo también podría

existir. En el paso (IV), los componentes críticos son el complejo R-AHL, la proteína-I y también probablemente los factores de transcripción que contribuyen al control de regulones de QS. El complejo R-AHL, el cual es un dímero, se une a secuencias palindrómicas conservadas de los promotores quórum-controlados, incluyendo el promotor del gen tipo *luxI*, y aumenta la producción de AHL (autoinducción) y la expresión de otros genes en el regulón de QS (Zhu y Winans, 1999; Qin et al., 2000; Schuster et al., 2004). En el paso (V), los componentes claves son uno o varios factores de transcripción y una enzima degradadora de AHL (AHL-lactonasa). Esta enzima también se ha identificado en el fitopatógeno *A. tumefaciens* que a su vez también produce 3-oxo-octanoil-homoserina lactona (3OC8-HSL), originalmente conocida como factor de conjugación que regula la transferencia del plásmido conjugativo Ti en *A. tumefaciens*. La producción de 3OC8-HSL es dependiente de la fase de crecimiento; la concentración de señales se incrementa en la fase exponencial de las células bacterianas, pero declina rápidamente durante la fase estacionaria (Zhang et al., 2002), lo cual es similar al patrón de transferencia del plásmido conjugativo Ti. La expresión de la AHL-lactonasa codificada por el gen *attM* está suprimida por el factor de transcripción negativo AttJ en la fase exponencial, pero es inducida en la fase estacionaria, explicando esto la disminución de 3OC8-HSL y la terminación de la transferencia del plásmido conjugativo Ti QS-dependiente (Zhang et al., 2002; Zhang et al., 2004; Dong y Zhang, 2005; Dong et al., 2007). Aunque, esta hipótesis fue refutada recientemente, mediante una mutación en el gen *attM* (ahora llamado *blcC*), los autores sugieren que este gen no está involucrado en la acumulación de AHL ni en la transferencia del plásmido (Khan y Farrand, 2009).

El sistema de dos componentes, mediado por péptidos, ha sido documentado tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Novick, 2003; Waters y Bassler, 2005). En este tipo de sistema de QS mediado por señales peptídicas, un precursor es cortado y así libera un péptido señal (PS) llamado AIP en *Staphylococcus aureus*, que se transporta al exterior de la célula por proteínas transportadoras ABC dependientes de ATP. La concentración de las señales de PS aumenta y al alcanzar un punto crítico se une a una proteína sensor quinasa (SK) activándola, ésta a su vez fosforila a un regulador de respuesta (RR) que está en el citosol, quien activa la transcripción de algunos genes.

Igual que con el sistema de QS tipo AHL, el proceso de QS tipo AIP también puede dividirse en los pasos I-IV, es decir, la generación de señales a nivel basal, acumulación de la señal, recepción de la señal, autoinducción de la señal y activación del regulón de QS. Sin embargo, no está claro si el último paso, decadencia de la señal, existe o no en el sistema QS tipo AIP (Dong et al., 2007).

5.2 Quorum quenching o inhibición de la comunicación celular

Los seres vivos están confinados en un ecosistema donde desarrollan las actividades biológicas que le permiten sobrevivir, pero éstos se encuentran rodeados de otras especies y por lo tanto están obligados a interactuar y desarrollar mecanismos de competencia que les permitan ampliar las posibilidades de éxito en las interacciones procariotas-procariota y procariota-eucariota. Durante años, microorganismos patógenos han causado enormes pérdidas humanas y económicas, pero con los avances científicos y mecanismos de defensa del huésped, muchas de las enfermedades se han venido controlando con antimicrobianos y agentes químicos. Dada la presencia de moléculas de señalización celular que permiten entre otras funciones, la activación de factores de virulencia, una gran diversidad de organismos tienen estrategias que les permite interrumpir la comunicación célula a célula de sus invasores, ésta es conocida como quórum-quenching (Q-Q).

Con el descubrimiento de antibióticos y el perfeccionamiento de vacunas en los últimos 70 años se controlaron la mayoría de las enfermedades, pero como en la mayoría de los casos, éstos imponen una presión de selección sobre los microorganismos, éstos desarrollaron resistencia y más aun, aparecieron bacterias multiresistentes. Por lo tanto, el Q-Q se enfoca como un mecanismo que al no imponer selección, promete ser una interesante alternativa para el control de enfermedades, aplicable a la medicina, agricultura y acuicultura (Defoirdt, et al., 2004; Rasmussen y Givskov, 2006; Dong et al., 2007).

En los últimos 10 años, los sistemas QS dependientes de AHLs llamaron la atención porque están involucrados en la regulación de diversas e importantes funciones biológicas y en particular, en la expresión de genes de virulencia de varios patógenos de animales

(incluyendo humanos) y de plantas (Dong et al., 2001; Dong et al., 2002). Hasta ahora, se han identificado varios mecanismos anti QS, como la existencia de moléculas antagonistas de AHLs del tipo furanonas halogenadas, producidas por la macro alga marina *Delisea pulchra* que actúan compitiendo por los receptores de las proteínas señal (Hentzer et al., 2002). Así mismo, otro de los mecanismos de competencia con AHLs son las haloperoxidasas producidas por organismos marinos, que interrumpen la comunicación célula-célula catalizando la oxidación de bromuro o cloruro con peróxido de hidrógeno produciendo compuestos microbicidas de ácido hipobromoso o ácido hipocloroso, respectivamente, los cuales han mostrado ser muy útiles para el control de biopelículas (Borchardt et al., 2001), y también sustancias químicas como el triclosan que inhibe la enoil-ACP reductasa cuyo producto es el intermediario esencial en la biosíntesis de AHL (Hoang y Schweizer, 1999), y el closantel que es un inhibidor potente de la histidina sensor quinasa del sistema de dos componentes (Stephenson et al., 2000; Dong et al., 2007), (figura 3).

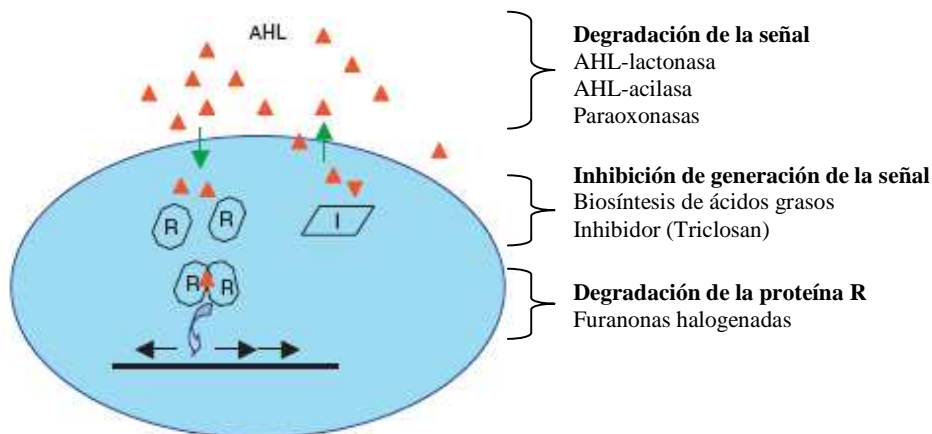


Figura 3. Modelo de interferencia de mecanismo de QS dependiente de AHL, tomado de Zhang y Dong (2004).

Además de las inactivaciones antagónicas y químicas descritas anteriormente, la habilidad de degradar moléculas de AHL también se logra a través de enzimas, las cuales están presentes tanto en eucariotas como procariontes; dentro de ellas está la AHL-lactonasa descubierta inicialmente en especies de *Bacillus*, AHL-acilasas en *Variovorax paradoxus* y

paraoxonasas (PON) presentes en eucariotas (Dong et al., 2000; Leadbetter et al., 2000; Chun et al., 2003).

5.2.1 AHL-lactonasa

La N-acil homoserina lactona hidrolasa, es una enzima específica que tiene como sustrato moléculas altamente conservadas de N-acil homoserina lactona, las cuales comparten un anillo homoserina lactona pero difieren en la longitud de la cadena o en la sustitución de la posición C3 de la cadena acilo; la AHL es hidrolizada en la posición 1 del anillo lactona por la enzima (figura 4).

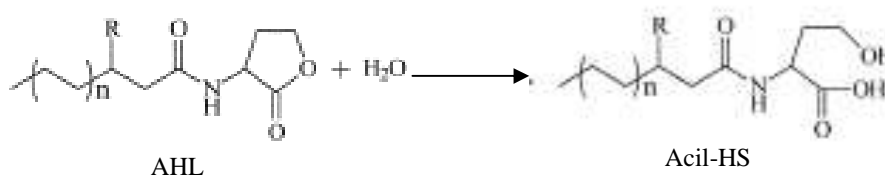


Figura 4. Estructura general de AHL y actividad AHL-lactonasa. Tomado de Dong y Zhang (2005).

Estas enzimas degradadoras de AHL se han reportado tanto en organismos procariontas como eucariotas (tabla 1). Con la ayuda de análisis filogenéticos se demostró que las AHL-lactonasas de procariontas pueden ser agrupadas en dos clusters, AiiA y AttM, donde las pertenecientes al primer cluster comparten una identidad mayor del 90% de la secuencia de la proteína, mientras que las de AttM comparten una identidad entre el 30 y 58%. Pero sorprendentemente, los clusters de procariontas tiene una homología proteica menor al 25% (Dong et al., 2000; Dong et al., 2002; Zhang et al., 2002). Por estudios de alineamiento de secuencias y mutagénesis se identificó que el motivo HXDH~H~D tiene importancia catalítica y está conservado en todas las lactonasas de los clusters AiiA y AttM, mientras las del cluster PON, requieren iones de Ca^{2+} para su actividad biológica (Dong et al., 2000; Billecke et al., 2000).

Tabla 1. Enzimas de quorum-quenching en procariotas y eucariotas. GNR*, gen no reportado.

Especie	Gen	Enzima	Referencia
Procariotas			
<i>Bacillus sp</i> 240B1	<i>aiiA</i>	AHL-lactonasa	Dong et al. 2000
<i>B. thuringiensis</i>	<i>aiiA</i>	AHL-lactonasa	Dong et al. 2002
<i>B. cereus</i>	<i>aiiA</i>	AHL-lactonasa	Dong et al. 2002
<i>B. mycoides</i>	<i>aiiA</i>	AHL-lactonasa	Dong et al. 2002
<i>B. anthracis</i>	<i>aiiA</i>	AHL-lactonasa	Ulrich, 2004
<i>A. tumefaciens</i>	<i>attM, aiiB</i>	AHL-lactonasa	Zhang et al. 2002
<i>Arthrobacter</i> VAI-A	<i>ahlD</i>	AHL-lactonasa	Flagan et al. 2003
<i>Klebsiella neumoniae</i>	<i>ahlK</i>	AHL-lactonasa	Park et al. 2003
<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	<i>qsda</i>	AHL-lactonasa	Uroz et al. 2008
<i>Ralstonia</i> XJ12B	<i>aiiD</i>	AHL-acilasa	Lin et al. 2003
<i>Pseudomonas</i> PAI-A	<i>pvdQ</i>	AHL-acilasa	Huang et al. 2003
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>pvdQ</i>	AHL-acilasa	Huang et al. 2003
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>quiP</i>	AHL-acilasa	Huang et al. 2006
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>ahlM</i>	AHL-acilasa	Park et al. 2005
<i>V. paradoxus</i> VAI-C	GNR*	AHL-acilasa	Leadbetter y Greenberg, 2000
Eucariotas			
<i>Sus scrofa domestica</i> (cerdo)	<i>ACY1</i>	Acilasa I	Xu et al. 2003
<i>Homo sapiens</i> (humano)	<i>PONs</i>	Paraoxonasa	Billecke et al. 2000
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo)	<i>PONs</i>	Paraoxonasa	Yang et al. 2005
<i>Mus musculus</i> (ratón)	<i>PONs</i>	Paraoxonasa	Yang et al. 2005
<i>Equus caballus</i> (caballo)	<i>PONs</i>	Paraoxonasa	Yang et al. 2005
<i>Ovis aries</i> (oveja)	<i>PONs</i>	Paraoxonasa	Yang et al. 2005
Bovinae (bovinos)	<i>PONs</i>	Paraoxonasa	Yang et al. 2005

Del grupo de las AHL-lactonasas, la enzima codificada por *aiiA* de *Bacillus thuringiensis* ha sido la mejor estudiada. Inicialmente Dong et al. (2000), a partir del aislamiento 240B1 de *Bacillus* (*AiiA*_{240B1}) plantearon que la enzima podría pertenecer a la superfamilia β -metalo-lactamasas (MBL, siglas en inglés) porque encontraron el motivo “His¹⁰⁴-X-His¹⁰⁶-X-Asp¹⁰⁸-His¹⁰⁹,” el cual es muy similar al motivo HXHXDH de unión a zinc de varias metalohidrolasas (glioxilasa II, arilsulfatasa y β -lactamasa). Posteriormente se estableció que el motivo “His¹⁰⁶-X-Asp¹⁰⁸-His¹⁰⁹-59X-His¹⁶⁹-21X-Asp¹⁹¹,” es esencial para la actividad catalítica de la enzima (Dong et al., 2002). Después de análisis bioquímicos y

determinación de estructura cristalina en la AHL-lactonasa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (AiiA_{BTK}), se estableció que la enzima contiene dos iones de zinc en el sitio activo y que todos los residuos directamente involucrados en la coordinación del metal están conservados en todas las AHL-lactonasas (Dong et al., 2002; Kim et al., 2005; Thomas et al., 2005; Dong et al., 2007).

Pero luego, con base a datos no publicados de Wang y Zhang, sino sólo mencionados en la revisión de Dong et al. (2007), dicen que confirmaron que al reemplazar His¹⁰⁴ con Ala en AiiA_{240B1} se anula la actividad de la enzima y por lo tanto, a diferencia de lo que se había propuesto, AiiA_{240B1} no es una metaloproteína y que la enzima también podría contener los iones de zinc. Además, señalan que la homología de aminoácidos de AiiA_{240B1} con AiiA_{BTK} es del 90% (Dong et al., 2000; Kim et al., 2005; Dong et al., 2007).

Por medio de análisis de la estructura cristalina se determinó que AiiA_{BTK} es una metaloproteína de 250 aminoácidos con plegamientos $\alpha\beta/\beta\alpha$ y con dos iones de zinc en el sitio activo. Kim et al. (2005) también propusieron un mecanismo catalítico en el que un nucleofílico con los dos iones de Zn²⁺ atacan el carbono carbonilo del sustrato. El anillo de la lactona y el oxígeno carbonilo de AHL interactúan con los iones Zn1 y Zn2 respectivamente, resultando en una mayor polarización del enlace carbonilo, haciéndolo más susceptible a un ataque nucleofílico. El ataque nucleofílico en el carbono carbonilo del sustrato resulta en la formación de un intermediario cargado negativamente, que puede ser estabilizado principalmente por las interacciones con el ión Zn1. El enlace C-O del anillo de la lactona luego se rompe para dar el producto, anillo-abierto; en este proceso Tyr¹⁹⁴ puede actuar como un ácido general para la protonación del grupo saliente (figura 5), (Kim et al., 2005, Momb et al., 2008).

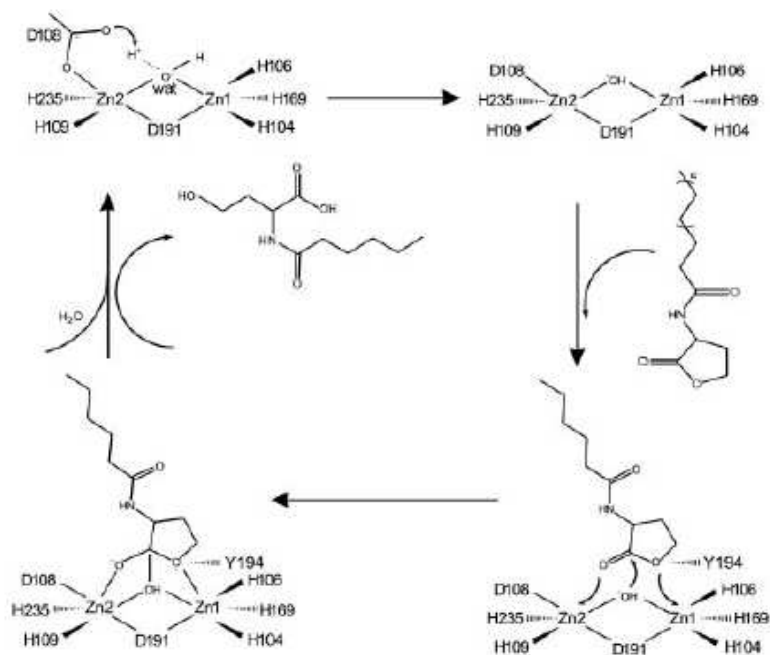


Figura 5. Mecanismo catalítico propuesto para AiiA_{BTK} por Kim et al. (2005). Para mayor detalle ver explicación en el texto.

5.2.2 AHL-Acilasas

La AHL-acilasa es otra enzima interruptora del QS, hidroliza el enlace amida de la N-ácil-homoserina lactona para liberar ácidos grasos y homoserina lactona (figura 6). Esta acilasa fue descubierta en *V. paradoxus*, una bacteria Gram negativa que utiliza AHL como fuente de energía y nitrógeno. Recientemente también se encontró en especies de *Ralstonia*, *Arthrobacter* VAI-A, *Pseudomonas* y *Sreptomyces* (Leadbetter y Greenberg, 2000; Lin, et al., 2003; Flagan et al., 2003; Park et al., 2005), (tabla 1).

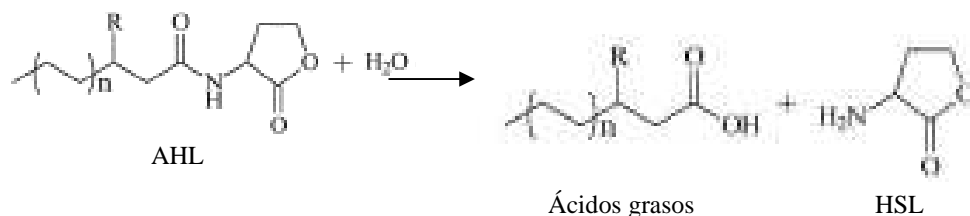


Figura 6. Estructura general de AHL y actividad AHL-acilasa. (Dong y Zhang, 2005).

Hasta ahora no se conoce el mecanismo enzimático de las acilasas respecto a su sustrato, pero si se tiene información sobre la especificidad de las diferentes AHL-acilasas. La AiiD de *Ralstonia* sp. XJ12B tiene preferencia por cadenas largas y cortas de AHLs, aunque en las últimas tiene menor eficacia; PvdQ de *P. aeruginosa* PAO1 no degrada AHLs con cadenas menores de ocho carbonos (Huang et al., 2003); AhlM de *Streptomyces* sp. tiene preferencia por AHLs menores de ocho carbonos (Park et al., 2005). Hasta ahora no se conoce el gen involucrado en la síntesis de acilasas en *V. paradoxus*.

Las enzimas AHL-acilasas AiiD, PvdQ y AhlM comparten muchas características con las hidrolasas Ntn y son muy similares estructuralmente a la acilasa cefalosporina de *Pseudomonas diminuta* (CAD), (Lin et al., 2003; Park et al., 2005), lo que sugiere que podrían compartir una estructura tridimensional similar; además, por los alineamientos de secuencias se estableció que hay diferencias en la posición de dos residuos (Ile⁵⁰ y Ser⁵⁷ en AiiD, Leu⁵⁰ y Asp⁵⁷ en PvdQ, Leu⁵⁰ y Ser⁵⁷ en AhlM y Gln⁵⁰ y Arg⁵⁷ en CAD). También hay reportes de acilasas con capacidad para degradar antibióticos como es el caso de la AhlM que hidroliza penicilina G, mientras que AiiD no tiene actividad biológica sobre penicilina G y ampicilina, esto sugiere que estas enzimas tienen especificidad por varios sustratos (Lin et al., 2003).

Las acilasas también se han encontrado en células eucariotas, la acilasa I (EC.3.5.14) aislada a partir del riñón de cerdo, hidrolizó C4-HSL y C8-HSL, la enzima parece preferir cadenas cortas de AHL pero su actividad puede ser cuestionable ya que tiene baja actividad sobre C4-HSL a pH neutros y ácidos (Xu et al., 2003; Dong et al., 2007). Todavía faltan investigaciones que permitan aclarar el mecanismo y especificidad de la enzima.

5.2.3 Paraoxonasas

Las paraoxonasas (PON) son enzimas dependientes de calcio que entre otros sustratos también hidrolizan el anillo de la homoserina lactona de las señales de AHL (figura 3); las PON (PON1, PON2 y PON3), participan en actividades fisiológicamente importantes como, metabolismo de drogas, desintoxicación de agentes neurotóxicos y organofosfatos,

hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos, ésteres de carbonatos cíclicos, lactonas aromáticas y lactonas alquilo (Billecke et al., 2000; Draganov y La Du, 2004; Ozer et al., 2005). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en los mamíferos, entre ellos, humanos, conejos, ratones, bovinos, caballos y ovejas (Yang et al., 2005). La actividad de PON de células epiteliales humanas sobre AHLs de *P. aeruginosa* fue reportada por primera vez por Chun et al. (2004) y su actividad contra AHL es preferiblemente con moléculas de cadenas largas (3-oxo-C12HSL).

Análisis de la estructura cristalina de una variante de PON1 (rePON1) muestra seis hojas β con dos iones de Ca^{2+} , uno más al interior que el otro, donde el más interno se presume, tiene función estructural, mientras el otro está relacionado con la catálisis del sustrato. Al parecer estos iones de Ca^{2+} interactúan con una molécula de agua, un átomo de oxígeno, un ión fosfato y cinco residuos aminoacídicos “Asn²²⁴, Asn²⁷⁰, Asn¹⁶⁸, Asp²⁶⁹ y Glu⁵³”. Como mecanismo enzimático se propone la desprotonación de una molécula de agua por los residuos His¹¹⁵-His¹³⁴ (también usados para la hidrólisis de fenil acetato y paraoxon) para generar un anión hidróxido, luego un ataque nucleofílico al éster carbonilo produciendo un intermediario oxianiónico y se presume que la carga negativa de los intermediarios está estabilizada por el calcio catalítico y finalmente el enlace C-O del éster intermediario se rompe (Harel et al., 2004; Dong et al., 2007).

Las enzimas PON, (PON1, PON2 y PON3) comparten una identidad peptídica del 60%. Estudios de alineación de secuencias mostraron que los residuos “Glu⁵³, His¹¹⁵, His¹³⁴, Asn¹⁶⁸, Asn²²⁴, Asp²⁶⁹ y Asn²⁷⁰,” están totalmente conservados en las tres enzimas indicando que podrían compartir el mismo mecanismo catalítico. Todavía faltan más estudios que permitan determinar mejor la especificidad y los mecanismos enzimáticos.

5.3 Aplicaciones de quórum quenching.

Después de la elucidación de los mecanismos de QS que emplean algunos microorganismos patógenos para atacar a su huésped se ha pensado que el Q-Q puede proporcionar herramientas esenciales para evaluar la viabilidad de nuevas estrategias aplicables a la

agricultura y la medicina. La primera evidencia de esta aplicabilidad la aportó un estudio en el que la expresión de *aiiA* en *E. carotovora*, llamada ahora *Pectobacterium carotovorum*, (patógeno de plantas) disminuyó la expresión de enzimas degradadoras de la pared celular (enzimas peptinolíticas) alrededor de un 10% y además atenuó los síntomas de la pudrición blanda en las plantas inoculadas (Dong et al., 2000). También se desarrollaron plantas transgénicas de tabaco y papa con el gen *aiiA* donde éstas fueron resistentes a la infección por *E. carotovora*, mientras que plantas control no transformadas, desarrollaron la enfermedad (Dong et al., 2001). Estas expresiones genéticas también se han realizado en microorganismos que son usados como controladores biológicos; *B. thuringiensis*, el cual produce la AiiA que reduce significativamente la pudrición blanda en papa cuando fue coinoculada con *E. carotovora*; el control de *B. thuringiensis* mutante, con delección en *aiiA* mostró menos o escaso efecto en el control de los síntomas de la enfermedad (Dong et al., 2004). Los mismos resultados se encontraron en especies de *Arthrobacter* y *P. fluorescens*, las cuales expresaban *aiiA* (Molina et al., 2003; Park et al., 2003).

Las acilasas también han servido como mecanismo de Q-Q; Lin et al. (2003), expresaron *aiiD* en el patógeno oportunista *P. aeruginosa* PAO1 y encontraron que disminuyeron las señales de AHL y la mortalidad del nemátodo *Caenorhabditis elegans* comparadas con el tipo silvestre de PAO1, ya que la expresión de esta enzima disminuyó la capacidad de formar biopelículas y la producción de elastasa y piocianina atenuando así la paralización del nemátodo.

La paraoxonasa PON1 se expresó en *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista que ataca principalmente a pacientes con fibrosis quística, quemaduras severas, enfermedades respiratorias crónicas o inmunocomprometidos, y se encontró que en el suero de ratón que contenía PON1 se degradaron las AHL y se previno la formación *in vitro* de biopelículas (Ozer et al., 2005). Recientes estudios han demostrado que la expresión de PONs humanas disminuye la resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos gentamicina y ceftazidima (Fhang et al., 2009).

Otros ensayos, como el tratamiento de pulmones de ratón infectados con *P. aeruginosa* con derivados de las furanonas naturales producidas por el alga *D. phulchra*, mostraron disminución en el número de células del patógeno así como de los síntomas (Hentzer et al., 2002).

Aunque existen muchas expectativas con las futuras aplicaciones del Q-Q, todavía faltan estudios que determinen los efectos que pueda causar este mecanismo de interrupción de la comunicación celular en bacterias benéficas que hacen parte de la microbiota, además de definir las condiciones que garanticen su efectividad, estabilidad, toxicidad y efectos secundarios en la agricultura, algunas de estas consideraciones también aplican a innovaciones farmacéuticas, aunque respecto a otras alternativas el Q-Q podría tener menos barreras ya que estas moléculas inhibidoras de la comunicación celular también son nativas del cuerpo humano.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Como cepas reporteras se utilizaron *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 y *Chromobacterium violaceum* CV026 donadas por el doctor J. Fuqua de la Universidad de Indiana, USA y el Instituto de Infección Inmunidad e Inflamación de la Universidad de Nottingham, Inglaterra respectivamente. La primera lleva una fusión de *lacZ* con *traI*, que produce una coloración azul en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) en respuesta a AHLs. La cepa de *C. violaceum* CV026 regula la producción o inhibición de un pigmento cuando está en presencia de AHLs (Ravn et al., 2001). Las anteriores se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) (1% peptona, 0.5% extracto de levadura, 1% de NaCl) solidificado con 1.0% de agar y suplementado con los antibióticos apropiados (*A. tumefaciens* en tetraciclina 4.5 μ g/ml y espectinomicina 50 μ g /ml; y *C. violaceum* en kanamicina 20 μ g /ml).

Para la valuación del efecto de los iones en la actividad AHL-lactonasa se usaron ocho soluciones de sales marca Merck ($MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $Pb(NO_3)_2$, $CuCl_2$, $AlCl_3$, $FeCl_2$ y KCl), donadas por el doctor Orlando Simón Ruiz de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos en esta investigación, previamente el gen *aiiA* del aislamiento de *B. thuringiensis* (147-11516) con actividad AHL-lactonasa fue subclonado en el vector pCold IV. Las células de expresión ArticExpress (DE3) fueron transformadas con el plásmido AiiA-pCold IV. La expresión de la proteína fue analizada por SDS-PAGE y teñida con azul de Coomassie. El sobrenadante obtenido del lisado de bacterias contenía las proteína de *B. thuringiensis*. De un cultivo de 1 litro se purificó la proteína por una columna de Ni, varias fracciones se mezclaron y dializaron contra PBS 1X. Luego la proteína blanco fue distribuida en 2 botellas, cada una con 2 mg de proteína

en 2.6 ml de PBS 1X a pH 7.4 y posteriormente fue liofilizada. Se obtuvo un porcentaje de pureza superior al 85%. Finalmente se obtuvieron 4 mg de la proteína AHL-lactonasa del gen *aiiA* de *B. thuringiensis* cepa 147-11516.

6.2 Fase I. Determinación de condiciones generales de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ del gen *aiiA* de *B. thuringiensis*

Para establecer condiciones previas que permitieron seleccionar los ensayos a cuantificar por medio de HPLC acoplado a espectrometría de masas, se hicieron ensayos de actividad enzimática con medición semicuantitativa con la ayuda de la cepa reportera *C. violaceum* CV026 que produce violaceina en presencia de la AHLs, si se observa una disminución o pérdida del pigmento es una medida indirecta de la actividad de AHL-lactonasa.

6.2.1 Detección de actividad biológica de la enzima purificada

Dos miligramos de AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ del gen *aiiA* de una cepa de *B. thuringiensis* se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril, a partir de esta solución se obtuvo una concentración de 35.6 mM de la enzima. La mezcla de reacción contenía 35.6 mM de AHL-lactonasa, 20 μ M de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-HSL) o N-octanoil-DL-homoserina lactona (C8-HSL) resuspendida en PBS 1X (pH 7.4), terminados los periodos de incubación de 30, 60 y 120 minutos a 30°C con agitación suave, el producto de hidrólisis se analizó mediante las cepas reporteras *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4. Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.2.2 Determinación del efecto de la temperatura, estabilidad térmica y pH en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

6.2.2.1 Efecto de la temperatura

Para evaluar el efecto de la temperatura, una solución de 287.2 μ l de Tris HCl 100 mM (pH 7.4) se mezcló con 12 μ l de C6-HSL a una concentración final de 20 μ M y se incubó a

diferentes temperaturas (0, 15, 26, 30, 40, 50, 60 y 70 °C) por 30 minutos, luego de este tiempo, la reacción se inició al agregar AHL-lactonasa a una concentración final de 100 μM , después de 120 minutos la reacción se paró con calor. Los productos de hidrólisis se analizaron con la cepa reportera *C. violaceum* CV026. Los tratamientos se realizaron por duplicado con sus respectivos controles.

6.2.2.2 Estabilidad térmica

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron así: 1.97 μl de enzima a una concentración final de 100 μM se resuspendieron en 670 μl en Tris HCl 100 mM (pH 7.4) y se incubaron a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70°C) durante cinco horas, después de varios tiempos (2, 3, 4 y 5 horas) se adicionaron 20 μM del sustrato (C6-HSL) y se dejaron 120 minutos más en incubación en agitación suave para que se diera la hidrólisis. Los productos de hidrólisis se analizaron con la cepa reportera *C. violaceum* CV026. Los tratamientos se hicieron por duplicado con sus respectivos controles.

6.2.2.3 Efecto del pH

Para determinar el efecto del pH en la actividad de la enzima, una suspensión 300 μl de buffer Tris HCl 100 mM a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8 y 9) y 110 μM de lactonasa se mezclaron con 12 μl de C6-HSL a una concentración final de 20 μM . La mezcla de reacción se incubó durante 60 y 120 min en agitación suave a 32 °C. Los productos de hidrólisis se analizaron con la cepa reportera *C. violaceum* CV026. Los tratamientos se montaron por duplicado con sus respectivos controles.

6.2.3 Efecto de iones y agente quelante en la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

Se valoraron ocho iones (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} y K^{+}), cada uno en diferentes concentraciones (0.2 y 2.0 mM), durante 60 y 120 minutos a 32 °C resuspendidos en PBS 1X (pH 7.4), se usaron concentraciones de 120 μM y 20 μM de enzima y C6-HSL respectivamente. Algunas soluciones de iones (Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} y

Fe²⁺), contenían EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a una concentración final de 10 mM para evitar que se precipitaran.

Para determinar el efecto de agentes quelantes en la actividad de la enzima se usó EDTA (10, 25 y 50 mM) en las mismas condiciones descritas arriba pero sin solución de iones. Los productos de hidrólisis se analizaron mediante la cepa reportera *C. violaceum* CV026. Los tratamientos se realizaron por duplicado con sus respectivos controles.

6.3 Fase II. Cuantificación y caracterización de la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ del gen *aiiA* de *B. thuringiensis*

6.3.1 Evaluación de la actividad de hidrólisis de AHL por la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

A un buffer de Tris HCl 100 mM (pH 7.4) se le adicionaron 3.37 µl (120 µM) de la enzima purificada AHL-lactonasa del gen *aiiA* de una cepa de *B. thuringiensis* y se mezcló con 0.25 mM de C6-HSL, la mezcla de reacción con un volumen final de 1 ml se incubó a 32°C por 10 minutos a 250 rpm. Cumplido el tiempo de incubación y para terminar la reacción enzimática, la suspensión fue expuesta a 100 °C por 90 segundos. Posteriormente los remanentes de la hidrólisis fueron analizados y cuantificados por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado con sus respectivos controles negativos: (sustrato y buffer sin enzima) y control de temperatura (buffer con sustrato sin calor y enzima). El control positivo tenía una concentración final de la enzima AHL-lactonasa de 1 mM. La actividad AHL-lactonasa se definió como la cantidad en micromoles de AHLs hidrolizados por minuto por miligramo de AHL- lactonasa.

6.3.2 Extracción y cuantificación de AHLs por HPLC-MS

Terminada la hidrólisis enzimática, la digestión fue extraída tres veces con medio volumen de acetato de etilo (Carlo Erba), cada fase orgánica se separó por centrifugación (11.000 rpm por 2 minutos), posteriormente la mezcla de los extractos se secó en un concentrador

ependorf vacufuge a 30°C. Los residuos del secado se disolvieron en metanol-agua (50:50, v/v) para su posterior análisis por HPLC-MS.

Para el análisis de HPLC se empleó un Cromatógrafo Líquido Agilent Serie 1200. Dos microlitros de solución de metanol-agua fueron inyectados dentro de una columna de fase reversa C₁₈ (Zorbax XDB, 4.6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 µm). El procedimiento de elución consistió en un perfil isocrático de metanol-agua (50:50, v/v) con acetato de amonio y ácido trifluoroacético (TFA) (5 mM y 0.05% respectivamente) a un flujo de 0.8 ml/min usando una micro-válvula divisora (Upchurch Scientific, USA). Los componentes separados por cromatografía líquida fueron inyectados para su detección y cuantificación en un espectrómetro de masa (ESI-MS) con cuadrupolo (modelo V1, Agilent) bajo condiciones de ión-positivo, se usó nitrógeno como gas de nebulización (1 p.s.i = 6894.76 Pa). El sustrato no hidrolizado se cuantificó con base a curvas de calibración realizadas con soluciones de patrones a concentraciones conocidas de los diferentes sustratos. Las condiciones de optimización de espectrometría de masas por ionización electrospray (siglas en inglés ESI-MS) están mencionadas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de optimización de ESI-MS para la cuantificación de N-acil-homoserina lactonas.

Parámetros en (ESI-MS)	N-acil-homoserina lactona			
	C ₄ -HSL	C ₆ -HSL	C ₇ -HSL	C ₈ -HSL
Voltaje capilar (V)	2500	2700	2700	4000
Voltaje de fragmentación (V)	70	90	90	110
Flujo de gas secante (L/min)	12.0	12.0	12.0	12.0
Presión de nebulización (p.s.i)	60	60	60	60
Temperatura de gas de secado	350 °C	350 °C	350 °C	350 °C
Rango de detección (m/z)	100-200	100-220	100-240	100-250

6.3.3 Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

Para analizar esta propiedad, la enzima AHL-lactonasa (120 μ M) se incubó a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C) en Tris HCl 100 mM (pH 7.4) durante dos horas y luego de transcurrido este periodo, la solución se incubó con C6-HSL a una concentración final de 0.25 mM por 10 minutos. Terminado el tiempo de incubación la suspensión se expuso a calor (100 °C) por 90 segundos para parar la reacción enzimática. Posteriormente los remanentes de la hidrólisis fueron analizados y cuantificados por HPLC-MS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles.

6.3.4 Evaluación de la estabilidad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ a diferentes pH

Para determinar el efecto del pH en la actividad AHL-lactonasa se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, excepto que la mezcla de hidrólisis se incubó a 32°C en buffer Tris HCl 100 mM a diferentes pH (5, 6, 7, 8 y 9). Luego las soluciones de actividad residual fueron analizadas y cuantificadas por HPLC-MS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles.

6.3.5 Efecto iones metálicos divalentes y de agentes quelantes en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

A una solución de PBS 1X (pH 7.4) se adicionaron 120 μ M de AHL-lactonasa y 0.25 mM de C6-HSL junto con diferentes soluciones de iones (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , y K^{+}) en dos concentraciones (0.2 y 2.0 mM). La suspensión de reacción con un volumen final de 500 μ l se incubó por 30 minutos a 32°C. La mezcla de reacción se paró con calor como se mencionó antes. Las soluciones que contenían los iones (Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} y Fe^{2+}) se mezclaron con EDTA 10 mM (pH 8.0) para evitar que se precipitaran a pH 7.4.

Como agente quelante se usó EDTA 10 mM sin solución de ión, con las mismas condiciones de ensayo y concentraciones de enzima y sustrato descritas anteriormente. Las lactonas residuales de la hidrólisis enzimática fueron cuantificadas por HPLC-MS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles.

6.3.6 Cinética y especificidad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

Para determinar la cinética enzimática a un buffer de Tris HCl 100 mM (pH 7.4) se adicionó AHL-lactonasa a una concentración final de 120 μ M y se mezcló con diferentes y varias concentraciones de sustratos (N-decanoil, octanoil, heptanoil, hexanoil y butanoil-DL-homoserina lactona) (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.31 y 0.16 mM) con un volumen final de 500 μ l. Las reacciones se incubaron a 30°C y se pararon con calor antes que se consumiera aproximadamente el 10% de cada sustrato.

En los ensayos de especificidad se evaluaron varios sustratos (N-decanoil, octanoil, heptanoil, hexanoil y butanoil-DL-homoserina lactona), con una concentración final de 3 mM y 120 μ M de sustrato y enzima respectivamente. Todos los ensayos se incubaron a 32°C y después de 10 minutos las reacciones se pararon con calor.

Las lactonas residuales de la hidrólisis enzimática fueron cuantificadas por HPLC-MS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles.

6.4 Análisis estadístico

Los datos resultantes de los ensayos en determinación del efecto de los iones y agente quelante (EDTA) en la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ se analizaron con el programa estadístico SigmaStat, mediante un análisis de varianza de dos factores y la prueba de Tukey para comparación múltiple de medias.

Los ensayos de especificidad fueron analizados con el mismo paquete estadístico mediante un análisis de varianza de un factor y la prueba de Tukey.

Para los resultados de cuantificación para actividad, pH y temperatura se calculó la media y la desviación estándar para todos los datos tomados por triplicado.

7. RESULTADOS

7.1 Fase I. Determinación de condiciones generales de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ del gen *aiiA* de *Bacillus thuringiensis*

7.1.1 Detección de actividad biológica de la enzima purificada

La enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ codificada por el gen *aiiA* de *B. thuringiensis* mostró actividad biológica frente a los sustratos C6-HSL y C8-HSL evidenciada en la ausencia de pigmentación en la cepa reportera CV026 y una disminución en la coloración de NTL4 (figura 7). La medición indirecta de la actividad AHL-lactonasa con las cepas reporteras expuso una posible preferencia por el sustrato C6-HSL ya que no se observó ningún halo alrededor de los tratamientos, considerando que en ambas mediciones se emplearon las mismas concentraciones de enzima y sustrato; por esta razón y para facilitar la selección de condiciones a evaluar y cuantificar por HPLC-MS todos los posteriores ensayos se continuaron sólomente con la cepa CV026.

Posteriormente, en experimentos no descritos en la metodología, se determinó que la concentración mínima de enzima capaz de hidrolizar su sustrato y de mostrar actividad detectable con las cepas reporteras estuvo entre 100-120 μ M. Del mismo modo se escogió al buffer Tris HCl 100 mM para evaluar la hidrólisis de las lactonas porque los buffer fosfatos inhibieron considerablemente la actividad de la AHL-lactonasa.

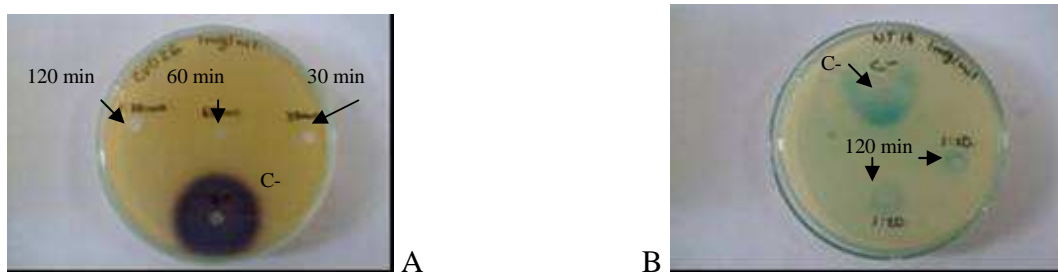


Figura 7. Evaluación de la actividad de AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ con cepas reporteras. **A.** Actividad lactonasa con C6-HSL y la cepa reportera *C. violaceum* CV026. **B.** actividad lactonasa con *A. tumefaciens* NTL4 con C8-HSL. (C-): control negativo (sustrato y buffer sin enzima).

7.1.2 Determinación del efecto de temperatura, condiciones de estabilidad térmica y pH en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

El efecto de la temperatura en la actividad AHL-lactonasa evaluada con la cepa CV026 mostró inhibición a bajas temperaturas, pero este comportamiento cambió positivamente a medida que se aumentó la temperatura; estos resultados fueron corroborados con los ensayos de estabilidad térmica donde la enzima mostró una gran estabilidad cuando se incubó a 60°C hasta por cinco horas (Tabla 3). Respecto a los controles negativos, éstos mostraron una leve hidrólisis del sustrato a 60°C y aún a 70°C sólo hubo una hidrólisis del 13 % (figura 8).

Tabla 3. Efecto de temperatura y evaluación de estabilidad térmica de la enzima en presencia de C6-HSL y la cepa reportera CV026. Escala de evaluación de la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ de acuerdo al tamaño del área coloreada alrededor del pozo. Diámetros de 0-1.9 mm (Actividad +++), 2-3.5 mm (Actividad ++), 3.6-5.0 mm (Actividad +) y >5.1 mm (Actividad -).

Efecto de temperatura en la actividad enzimática		Estabilidad térmica de la enzima	
Temperatura (°C)	Actividad	Temperatura/tiempo (°C/horas)	Actividad
0	-	30/5	+++
15	-	40/ 5	+++
26	++	50/ 5	+++
30	+++	60/ 5	+++
40	+++	70/2	++
50	+++	70/3	+
60	+++	70/4	+
70	+++	70/5	+

La AHL-lactonasa no tuvo actividad biológica detectable con la cepa reportera CV026 a pH ácidos, pero si a pH neutro y básicos. Los controles negativos de pH 4, 5, 6, 7 y 8 no tuvieron lactonólisis, pero el control negativo (buffer y sustrato) de pH 9.0 mostró un 50 % de lactonólisis, interfiriendo esto con la evaluación del comportamiento de la enzima a este pH (Tabla 4).

En todos estos ensayos la actividad AHL-lactonasa fue medida por el diámetro de los halos coloreados alrededor del pozo con la cepa reportera CV026, después de la incubación de las cajas de petri a 30°C por 16 horas. Así mismo, se evaluó la actividad enzimática teniendo en cuenta que el tamaño del área coloreada fue inversamente proporcional a la actividad de la AHL-lactonasa, debido a que la degradación de las moléculas de AHLs por acción de la AHL-lactonasa hizo que las cepas reporteras no las pudieran detectar y por lo tanto no produjeron el color. De acuerdo al tamaño del halo observado, en milímetros, éstos fueron clasificados en intervalos de la siguiente manera: de 0 a 1.9 mm (+++), que corresponde a una alta actividad AHL-lactonasa, de 2 a 3.5 mm (++) actividad media, de 3.6 a 5.0 mm (+) actividad baja y mayor a 5.1 mm (-) actividad nula.

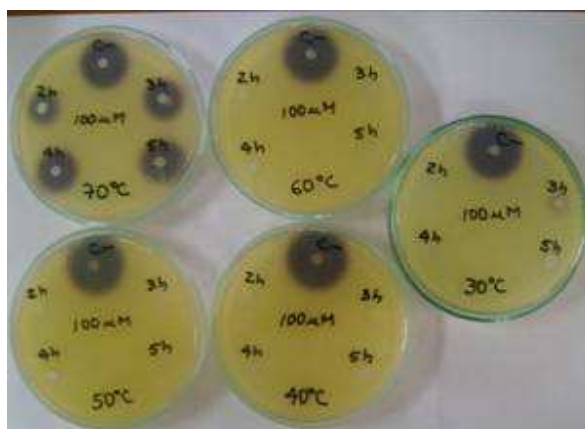


Figura 8. Evaluación de estabilidad térmica en la actividad AHL-lactonasa. El comportamiento de la actividad se evaluó a 20 y 100 μ M de C6-HSL y enzima respectivamente en diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70°C) en tiempos de incubación hasta por cinco horas. (C-): control negativo sólo contenía buffer Tris HCl 100 mM (pH 7.4) y C6-HSL.

Tabla 4. Efecto del pH en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ en presencia de C6-HSL evaluados con la cepa reportera CV026. Escala de evaluación de la actividad AHL-lactonasa de acuerdo al tamaño del área coloreada alrededor del pozo. Diámetros de 0-1.9 mm (Actividad +++), 2-3.5 mm (Actividad ++), 3.6-5.0 mm (Actividad +) y >5.1 mm (Actividad -).

Efecto del pH en la actividad de la enzima		
pH	Actividad 60 min	Actividad 120 min
4	-	-
5	-	-
6	+	+
7	+++	+++
8	+++	+++
9	+++	+++

7.1.3 Efecto de iones y del agente quelante en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇.

11516

Los iones Al^{3+} y Cu^{2+} , resuspendidos en PBS 1X (pH 7.4) inhibieron totalmente la actividad de la enzima en las dos concentraciones evaluadas (0.2 – 2.0 mM). Asimismo, al incrementar las concentraciones de los iones Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} a 2.0 mM se afectó parcialmente el desempeño de la AHL-lactonasa. Mientras que a 0.2 mM en los iones Pb^{2+} y K^{+} no se observó ningún cambio negativo (figura 9).

El agente quelante EDTA no perturbó negativamente la enzima en ninguna de las tres concentraciones evaluadas. Pero los controles negativos mostraron que inhibió un poco el crecimiento de CV026 (figura 10).

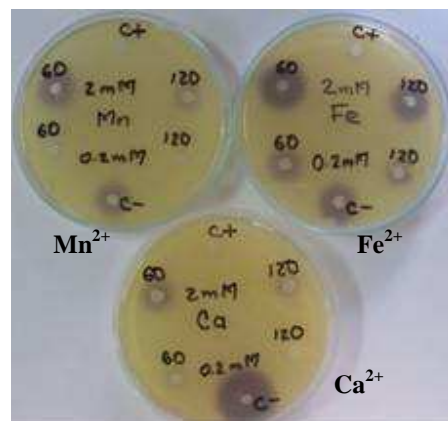


Figura 9. Efecto de iones en la actividad de la enzima AHL-lactonasa. En la foto, algunos de los iones evaluados (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+}) a dos concentraciones (0.2 y 2.0 mM) resuspendidos en PBS 1X y C6-HSL, las evaluaciones se terminaron después de 60 y 120 min de reacción. C+, control positivo. C-, control negativo.



Figura 10. Efecto de agente quelante en la actividad de la enzima. El EDTA se evaluó en concentraciones de 50, 25 y 10 mM durante 30, 60, 90 y 120 minutos. (C-): solución de PBS 1X con EDTA y C6-HSL, las reacciones se terminaron a los 30, 60, 90 y 120 minutos de reacción. C-PBS, solución de PBS 1X con C6-HSL sin EDTA.

7.2 Fase II. Cuantificación y caracterización de la actividad AHL-lactonasa del gen *aiiA* de la cepa *B. thuringiensis*₁₄₇₋₁₁₅₁₆

7.2.1 Evaluación de la actividad de hidrólisis de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante

Para el cumplimiento de este objetivo primero se determinó el tiempo de reacción enzimática (10 min) de acuerdo a los resultados encontrados después de determinar que en este tiempo sólo se había consumido cerca del 10 % del sustrato. La AHL-lactonasa del gen *aiiA* de *B. thuringiensis* cepa 147-11516 tuvo una actividad de $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ con el sustrato C6-HSL. La actividad lactonasa se definió como la cantidad en micromoles de AHLs hidrolizados por minuto por miligramo de AHL-lactonasa. La cuantificación del sustrato en los controles negativos fue del 98%.

7.2.3 Extracción y cuantificación de AHLs por HPLC-MS

En ensayos preliminares, se probaron dos solventes (diclorometano y acetato de etilo) con el fin de seleccionar el solvente con el que se obtuviera la mejor extracción de AHLs, para así cuantificar el sustrato no hidrolizado por la enzima; de ellos se escogió al acetato de etilo porque permitió extracciones superiores al 96 % mientras con el diclorometano sólo se alcanzó un 90%. Del mismo modo se optimizó la extracción de tal manera que se pudo omitir la adición de MgSO_4 quien se hidrataba con la fase acuosa después de cada extracción.

La cuantificación de las AHLs no hidrolizadas por la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ se realizó mediante HPLC-ESI-MS, se seleccionaron los iones de cada sustrato (C4-HSL, C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL y C10-HSL) que se encontraban en mayor abundancia (tabla 5), pero C10-HSL se precipitó demostrando poca solubilidad con la fase móvil (metanol:agua, TFA y acetato de amonio).

Posteriormente, con los iones seleccionados y las condiciones optimizadas de ESI-MS (tabla 2), se logró separar todos los sustratos y se determinaron los tiempos de retención para cada uno de ellos (C4-HSL: 2.3 min; C6-HSL: 4.8 min; C7-HSL: 8.4 min y C8-HSL: 16 min), los cuales aumentaban de acuerdo al peso molecular del sustrato. Las figuras 12 y 13 muestran los respectivos cromatogramas.

Tabla 5. Iones seleccionados para cuantificar la actividad residual de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ sobre N-acil homoserina lactonas.

N-HSL	Iones <i>m/z</i>		
	$[C_4H_7NO_2 + H]^+$	$[M + H]^+$	$[M + H - C_4H_7NO_2]^+$
C4-HSL	102	172.2	
C6-HSL	102	200.2	
C7-HSL	102	214.3	113.3
C8-HSL	102		127.3

Para cuantificar las AHLs se graficaron curvas de calibración con concentraciones conocidas de cada sustrato las cuales tenían coeficientes de correlación mayores a 0.995, que aumentó a medida que se disminuía el volumen de inyección.

Los análisis de ESI-MS muestran la abundancia relativa de los iones seleccionados para cada sustrato (ver literal A de las figuras 14-17). Con la finalidad de comprobar la presencia del producto de hidrólisis enzimática de la AHL-lactonasa, se aumentó el rango de detección (*m/z*) y se detectaron todos los iones correspondientes al producto, comprobando así la incorporación de una molécula de agua al anillo homoserina lactona resultado de la actividad catalítica que genera como producto acil homoserina (figura 11), (ver literal B de las figuras 14-17).

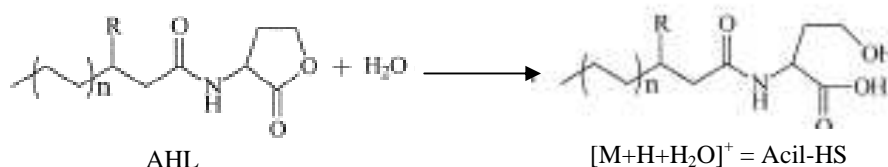


Figura 11. Hidrólisis de AHL por actividad AHL-lactonasa. El hidrógeno corresponde a una protonación por el ácido presente en la fase móvil.

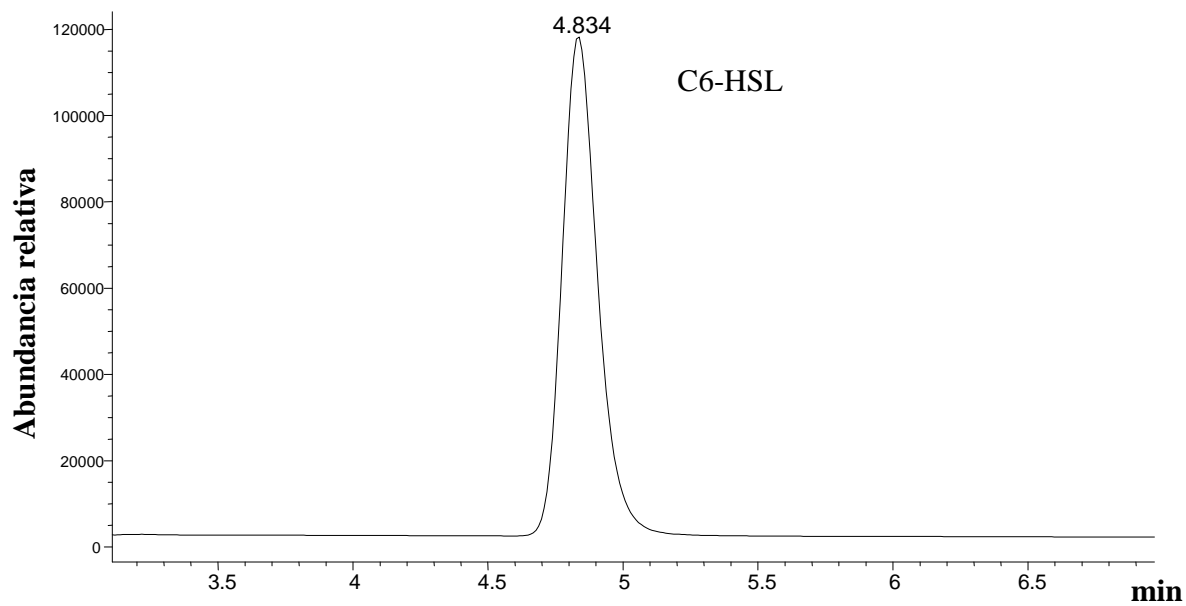
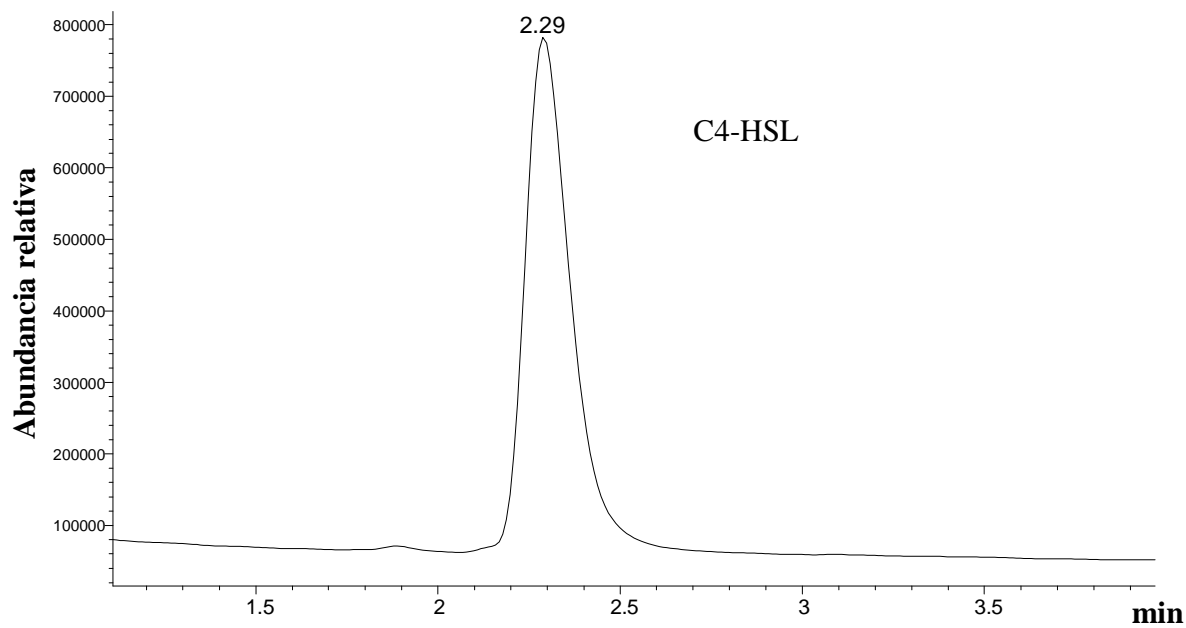


Figura 12. Cromatograma de butanoil homoserina lactona y hexanoil homoserina lactona (C4-HSL y C6-HSL) con sus respectivos tiempos de retención en minutos. Las condiciones cromatográficas e iones seleccionados están descritas en el texto y tabla 5 respectivamente.

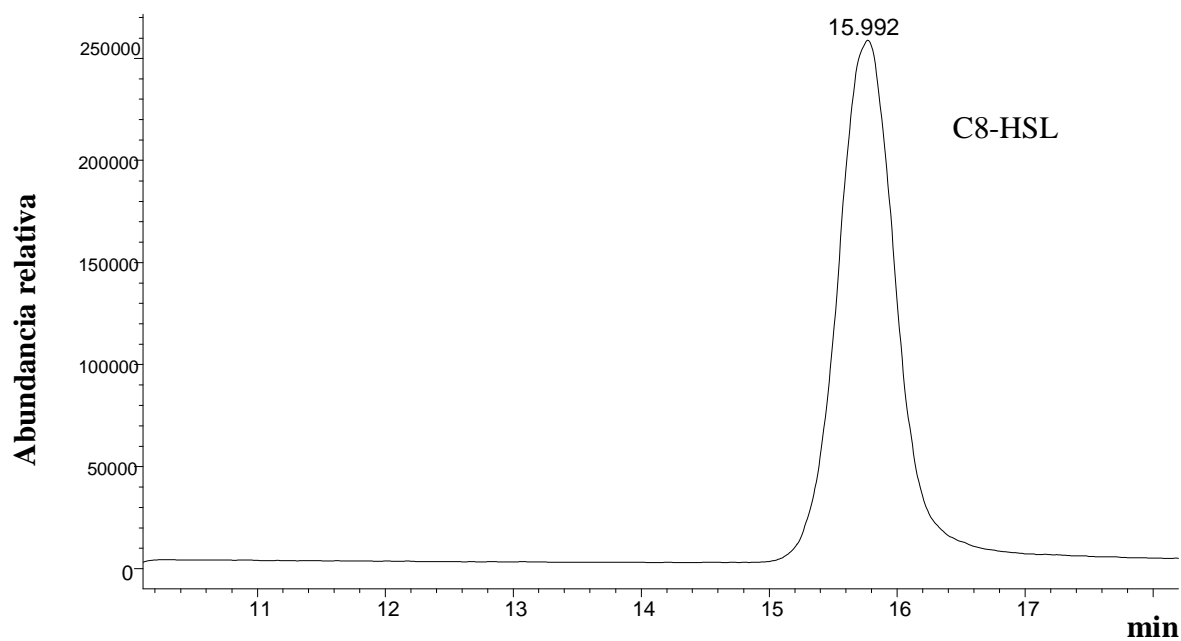
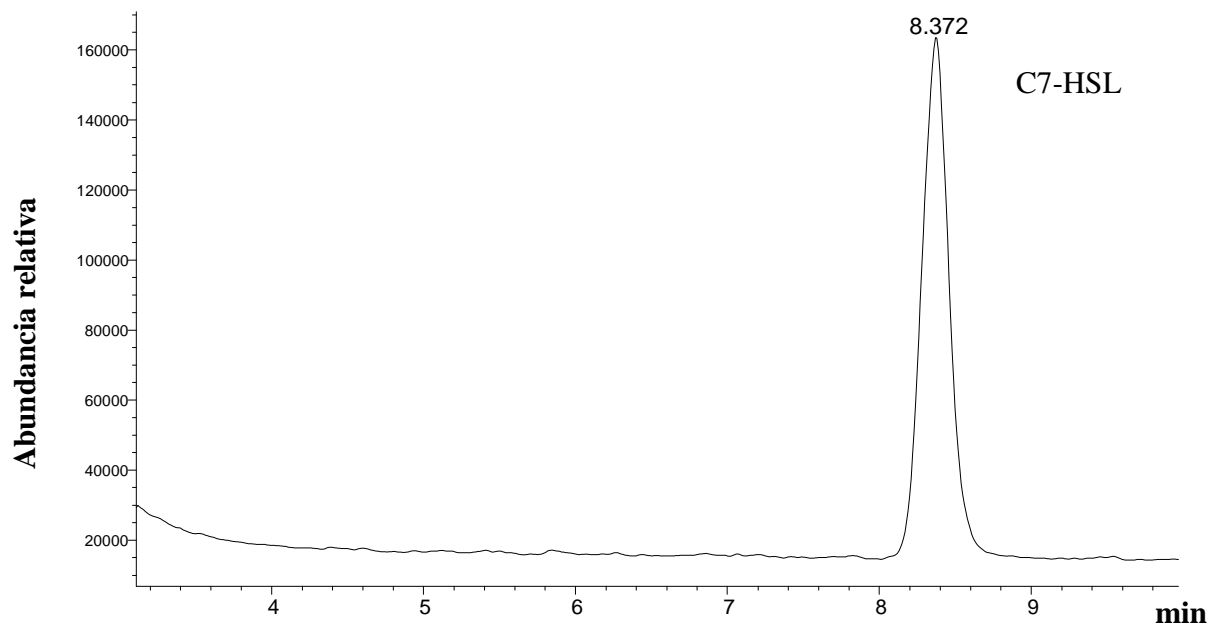


Figura 13. Cromatograma de heptanoil homoserina lactona y octanoil homoserina lactona (C7-HSL y C8-HSL) con sus respectivos tiempos de retención en minutos. Las condiciones cromatográficas e iones seleccionados están descritas en el texto y tabla 5 respectivamente.

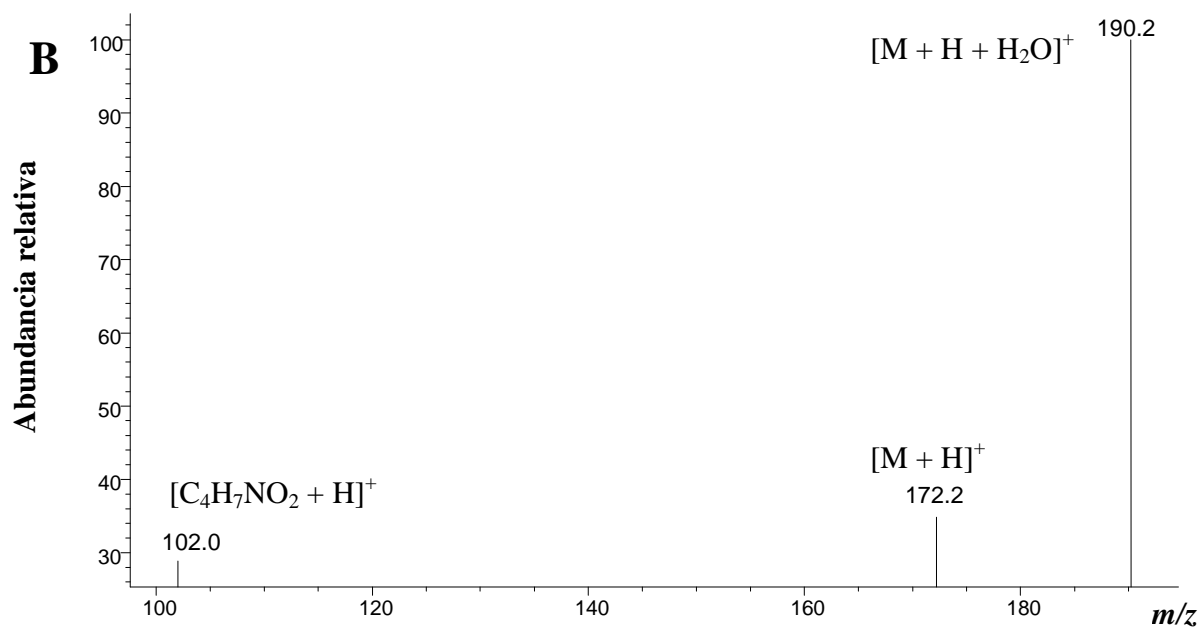
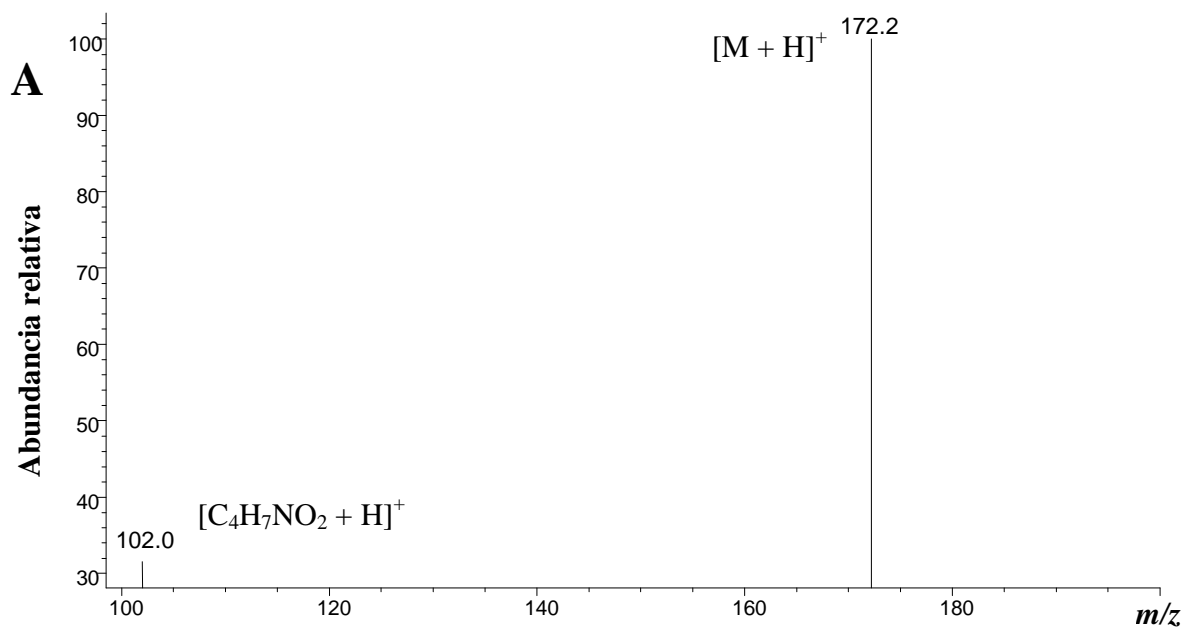


Figura 14. Espectro de masas ESI-MS de N-butanoil homoserina lactona. (A) Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 2.3 min. (B) El ión con una m/z de 190.2 corresponde al producto de hidrólisis de AHL-lactonasa sobre C4-HSL.

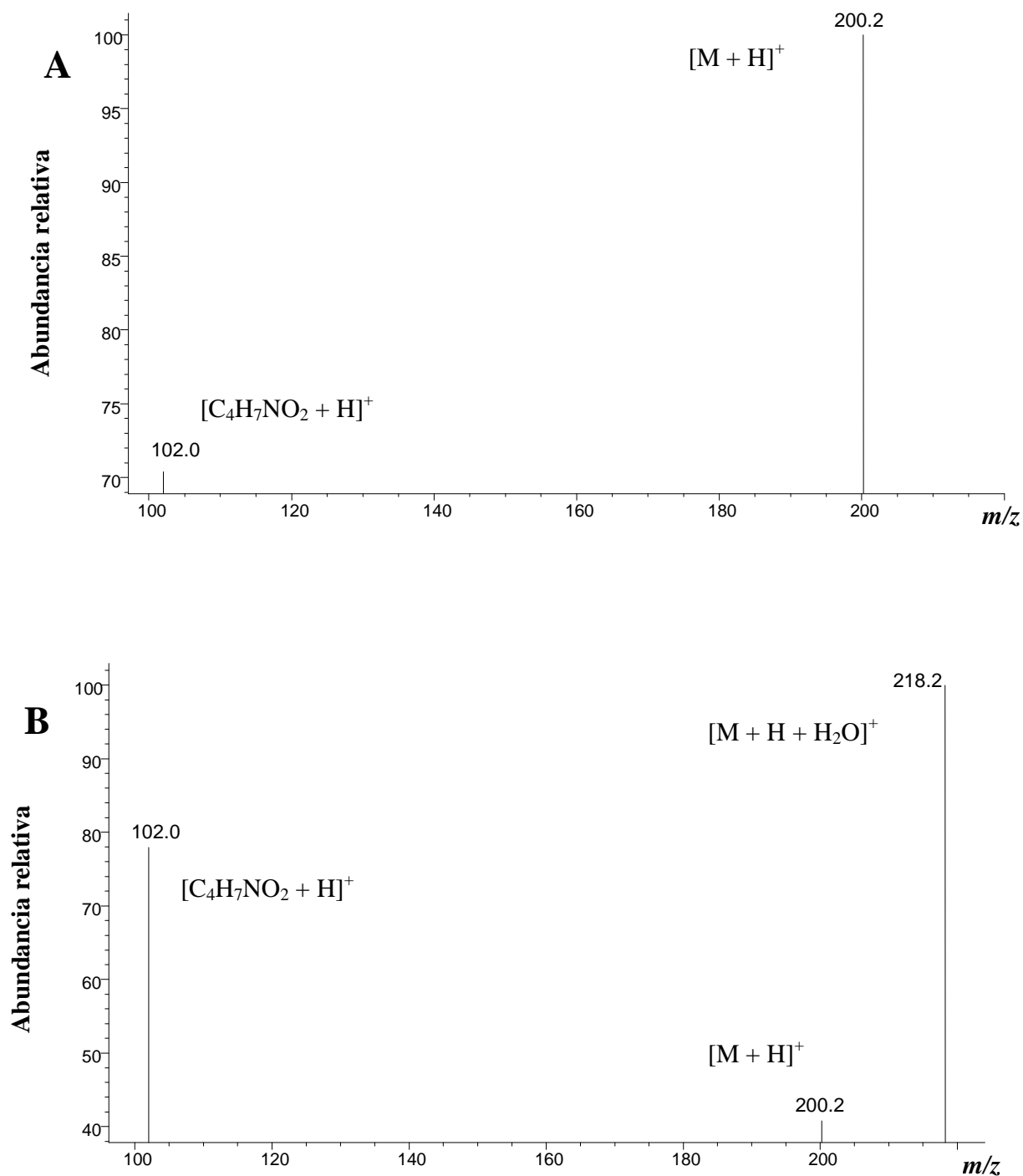


Figura 15. Espectro de masas ESI-MS de N-hexanoil homoserina lactona. (A) Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 4.3 min. (B) El ión con una m/z de 218.2 corresponde al producto de hidrólisis de AHL-lactonasa sobre C6-HSL.

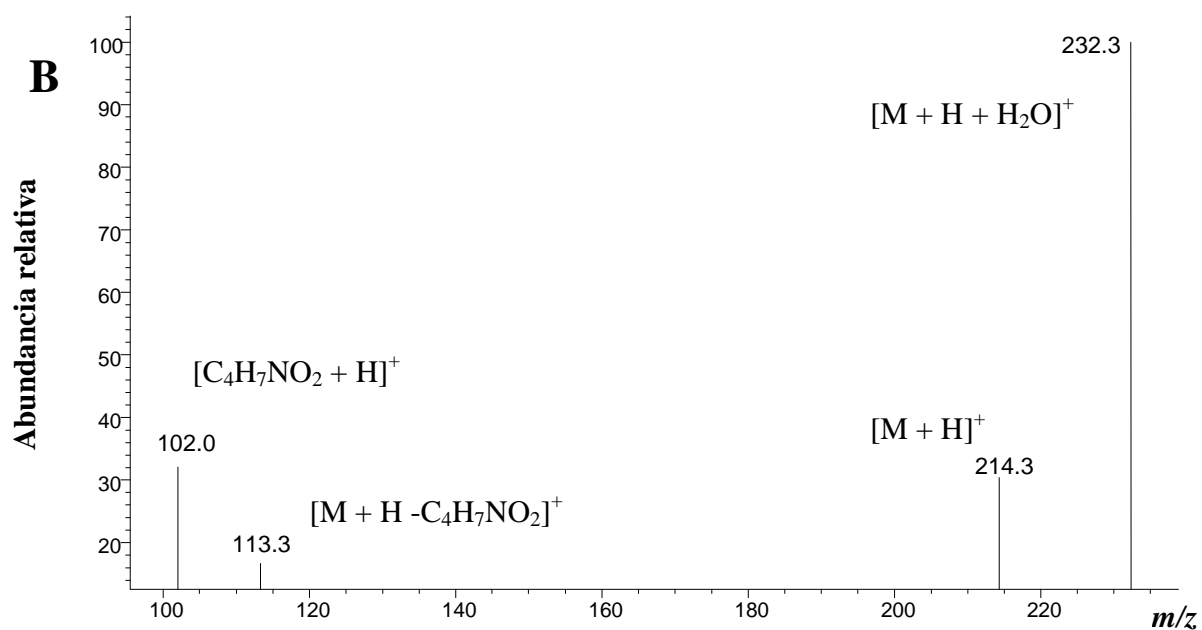
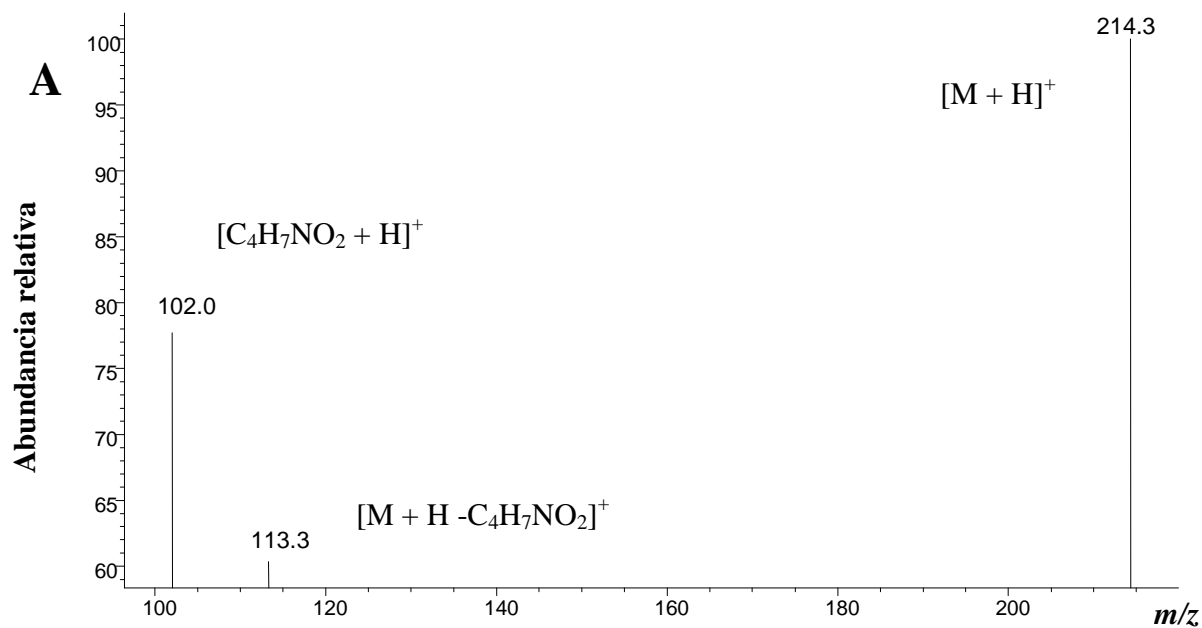


Figura 16. Espectro de masas ESI-MS de N-heptanoil homoserina lactona. (A) Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 8.4 min. (B) El ión con una m/z de 232.3 corresponde al producto de hidrólisis de AHL-lactonasa sobre C7-HSL.

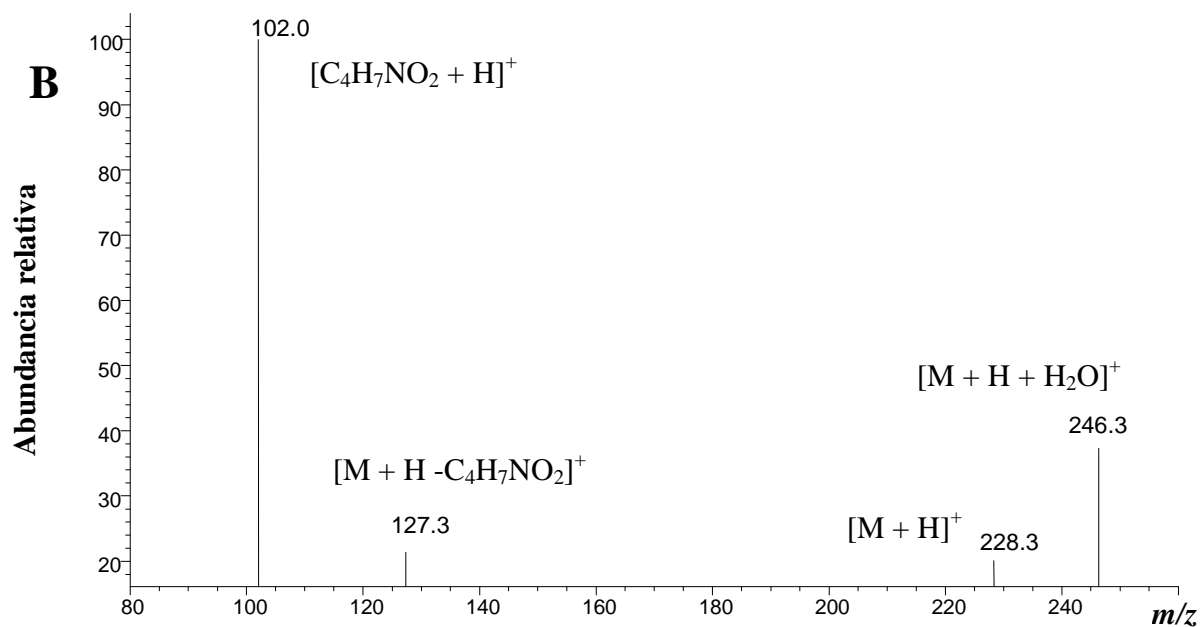
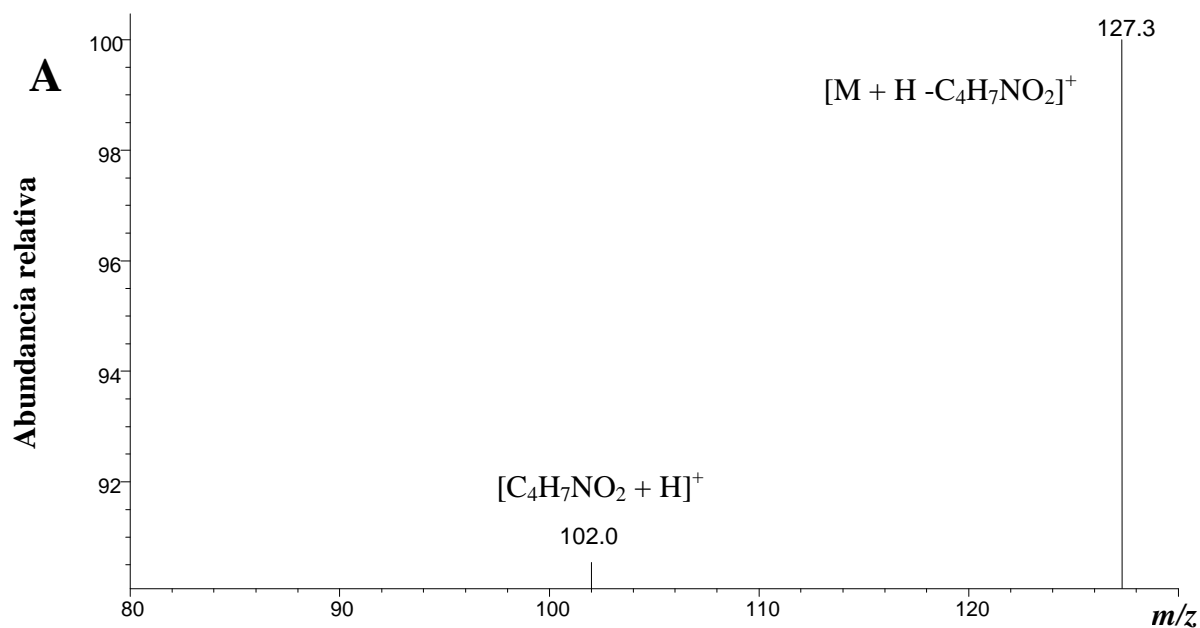


Figura 17. Espectro de masas ESI-MS de N-octanoil homoserina lactona. (A) Iones presentes en las fracciones de HPLC a los 16 min. (B) El ión con una m/z de 246.3 corresponde al producto de hidrólisis de AHL-lactonasa sobre C8-HSL.

7.2.4 Evaluación de la estabilidad térmica de la enzima recombinante

Después de dos horas de incubación en condiciones controladas y a diferentes temperaturas, la AHL-lactonasa recombinante mostró mayor estabilidad a 30°C, no obstante, a 40 y 50°C conservó el 64 y 60 % respectivamente de su actividad biológica, mientras que a 20 y 70°C la AHL-lactonasa hidrolizó 45 y 60% respectivamente de la C6-HSL (figura 18). No se observó hidrólisis causada por la temperatura en los controles negativos, excepto a 70 °C donde se observó una degradación del 20%.

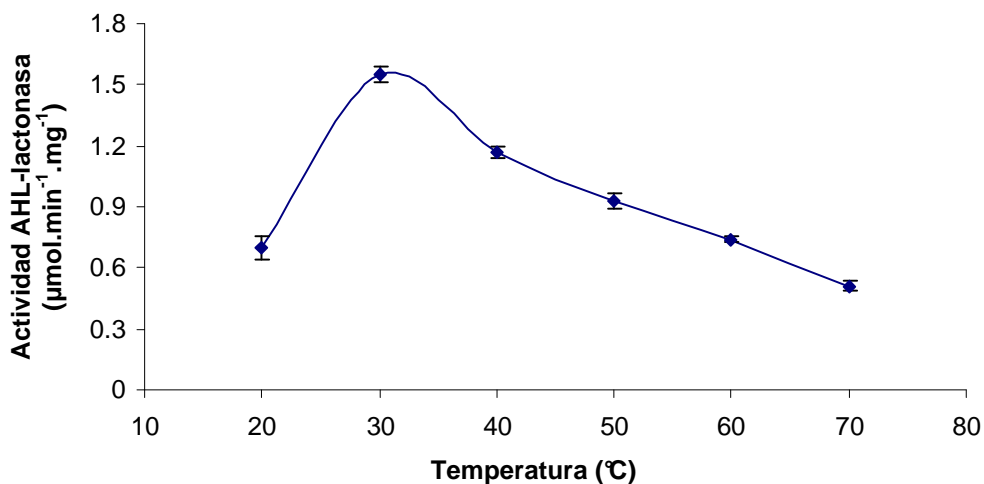


Figura 18. Evaluación de la estabilidad térmica de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante. La enzima hidrolizó C6-HSL a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70°C) durante 10 minutos. El tiempo de incubación de la enzima en Tris HCl 100 mM (pH 7.4) fue de 2 horas.

7.2.5 Evaluación de la estabilidad de la enzima recombinante a diferentes pH

El pH para actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ se determinó utilizando soluciones con un rango de pH entre 5.0 y 9.0 usando C6-HSL como sustrato. La actividad enzimática aumentó con el incremento del pH y alcanzó su máxima actividad a pH 8.0, luego declinó a pH 9.0. En condiciones ácidas la actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ se redujo a un 28% (figura 19). Los controles negativos mostraron una marcada lactonólisis a pH 9.0, confirmando los resultados encontrados con la cepa reportera CV026.

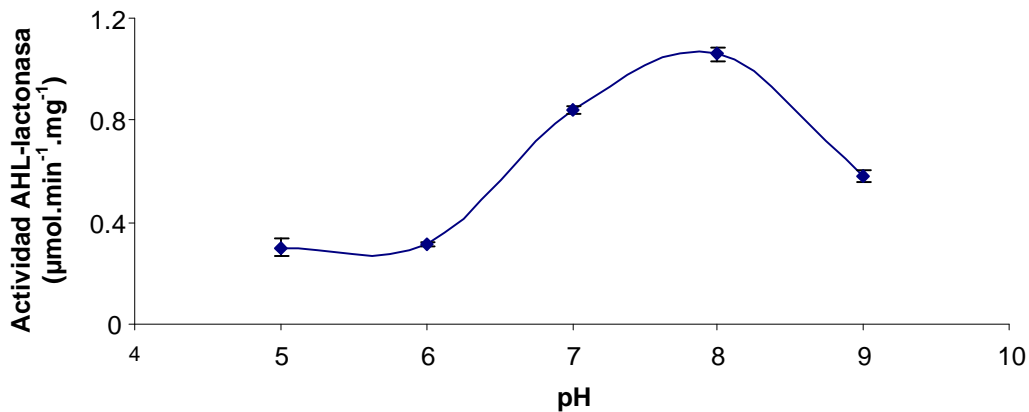


Figura 19. Efecto del pH en la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante. La actividad fue evaluada con el buffer Tris HCl 100 mM a diferentes valores de pH (5, 6, 7, 8 y 9) usando C6-HSL como sustrato durante un tiempo de reacción de 10 minutos a 32°C.

7.2.6 Efecto de los iones metálicos y del agente quelante en la actividad de AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

El efecto de los iones y del agente quelante EDTA en la actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ se determinó con la ayuda del programa estadístico SigmaStat, mediante análisis de varianza de dos factores y con la prueba de Tukey para comparación múltiple entre medias de los diferentes tratamientos (Anexo 1). Todos los iones monovalentes, divalentes y trivalentes evaluados (figura 20), mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control, compuesto por PBS 1X, C6-HSL, enzima y con ausencia de iones y EDTA (tabla 6).

Los resultados muestran que en mezclas de reacción enzimática a concentraciones 0.2 mM de los iones, la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ estuvo entre 0 y 82%, siendo completamente abolida por el Cu²⁺; del mismo modo al aumentar la concentración de los iones a 2.0 mM, la actividad enzimática disminuyó en todos los tratamientos determinándose ésta en un rango entre 0 y 32%, anulándose completamente en las soluciones que contenían Cu²⁺ y Mn²⁺ (figura 20).

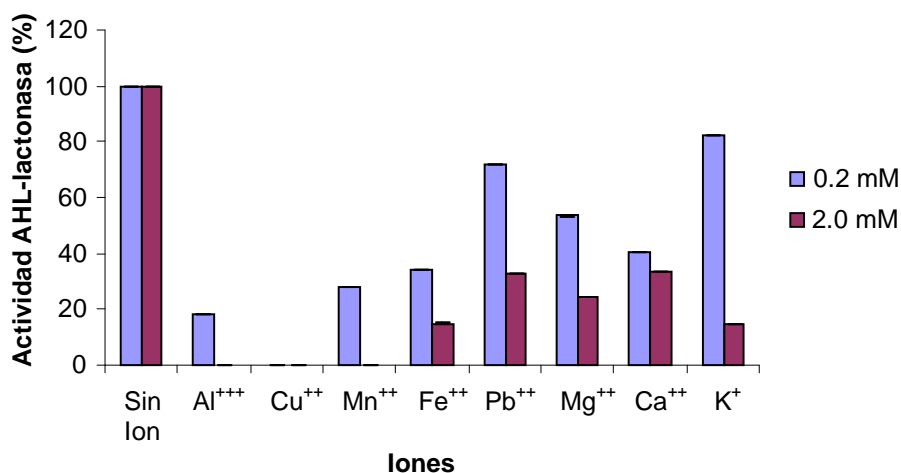


Figura 20. Efecto de los iones en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante. Se evaluó el efecto de dos concentraciones (0.2 y 2.0 mM) de los iones en la hidrólisis del sustrato. La actividad hacia C6-HSL (1.065 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) fue definida como un 100%.

Tabla 6. Comparaciones estadísticas del efecto de iones y del agente quelante EDTA en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆. Si el valor P es menor que 0.05 hay diferencias estadísticamente significativas.

Comparaciones	Diferencia de medias	P	P < 0.050
PBS 1X vs. Cu ²⁺	1.605	<0,001	Si
PBS 1X vs. Al ³⁺	0.996	<0,001	Si
PBS 1X vs. Mn ²⁺	0.916	<0,001	Si
PBS 1X vs. Fe ²⁺	0.829	<0,001	Si
PBS 1X vs. Mg ²⁺	0.696	<0,001	Si
PBS 1X vs. Ca ²⁺	0.670	<0,001	Si
PBS 1X vs. K ⁺	0.550	<0,001	Si
PBS 1X vs. Pb ²⁺	0.510	<0,001	Si
PBS 1X vs. EDTA	0.0454	<0,001	No

De los ocho iones evaluados en la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆, seis de ellos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones 0.2 y 2.0 mM, excepto en los iones Cu²⁺ y Ca²⁺, es decir las dos concentraciones de estos dos iones causan el mismo comportamiento negativo en la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ (tabla 7).

Las comparaciones en la actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ entre mezclas de reacción con los diferentes iones evaluados a 0.2 mM mostraron diferencias estadísticamente significativas, excepto entre los iones Pb²⁺ y K⁺, Mg²⁺ y Fe²⁺, Ca²⁺ y Mn²⁺, Mn²⁺ y Al³⁺, además de Al³⁺ y Cu²⁺ (anexo 1).

Tabla 7. Comparaciones estadísticas del efecto de iones en la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆. Si el valor P es menor que 0.05 hay diferencias estadísticamente significativas.

Comparaciones	Diferencia de medias	P	P < 0.050
0.2 mM vs. 2.0 mM de Al ³⁺	0.139	<0,001	Si
0.2 mM vs. 2.0 mM de Cu ²⁺	7.633E-017	<0,001	No
0.2 mM vs. 2.0 mM de Mn ²⁺	0.297	<0,001	Si
0.2 mM vs. 2.0 mM de Fe ²⁺	0.255	<0,001	Si
0.2 mM vs. 2.0 mM de Pb ²⁺	0.416	<0,001	Si
0.2 mM vs. 2.0 mM de Mg ²⁺	0.221	<0,001	Si
0.2 mM vs. 2.0 mM de Ca ²⁺	0.0717	<0,001	No
0.2 mM vs. 2.0 mM de K ⁺	0.720	<0,001	Si

Del mismo modo, al usar soluciones de reacción a concentraciones finales de iones 2.0 mM, la mayoría de las reacciones enzimáticas mostraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ excepto entre Ca²⁺ y Mg²⁺, Mg²⁺ y Fe²⁺, conjuntamente con K⁺ y Mn²⁺, por lo tanto, causarían el mismo efecto en la actividad de la enzima si se usa esta concentración entre cualquiera de los iones mencionados anteriormente (anexo 1).

La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ en presencia de EDTA 10 mM tuvo una actividad del 95.7 % respecto al control y no mostró diferencias estadísticamente significativas indicando que no tiene ningún efecto negativo en la actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ (tabla 6).

7.2.7 Cinética y especificidad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante

Los parámetros cinéticos de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ se determinaron según la ecuación de Michaelis-Menten y la representación gráfica de Lineweaver-Burk. La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ mostró actividad hidrolítica contra AHLs con cadenas acilo de diferentes longitudes con valores de K_m entre 0.5 y 8.84 mM, que señalan una gran afinidad de la enzima por los diferentes sustratos, sin embargo presenta constantes de afinidad y eficacia bajas (Tabla 8).

Los valores de la hidrólisis de C8-HSL podrían ser considerados como un estimado porque este sustrato mostró poca solubilidad a concentraciones mayores de 2.5 mM en el buffer Tris HCl 100 mM (pH 7.4) usado para estos ensayos.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante usando AHLs de diferentes longitudes de cadena acilo.

AHLs	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (mM ⁻¹ /s ⁻¹)
C4-HSL	0.50	5.49 x 10 ⁻³	1.09 x 10 ⁻²
C6-HSL	0.86	1.02 x 10 ⁻²	1.19 x 10 ⁻²
C7-HSL	8.84	2.35 x 10 ⁻²	2.66 x 10 ⁻³
C8-HSL	3.81	4.46 x 10 ⁻²	1.17 x 10 ⁻²

Para evaluar la especificidad de la enzima también se usaron N-decanoil, octanoil, heptanoil, hexanoil y butanoil-DL-homoserina lactona, las cuales tienen cadenas acilo de diferentes longitudes sin sustituciones (figura 21). La enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ mostró su mayor actividad sobre C4-HSL, resultado que indica mayor degradación del sustrato a medida que disminuye la longitud de la cadena acilo, además se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre C6-HSL y C7-HSL, pero si existen entre los demás sustratos probados (tabla 9; anexo 2). No se logró determinar la actividad enzimática sobre C10-HSL y la de C8-HSL podría considerarse un estimado debido a la poca solubilidad de estos sustratos en el buffer usado para la reacción enzimática.

Tabla 9. Comparaciones estadísticas de sustratos con diferentes longitudes de cadena acilo en la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆. Si el valor P es menor que 0.05 hay diferencias estadísticamente significativas.

Comparaciones	Diferencias de medias	P	P < 0.050
C8-HSL vs. C7-HSL	25.163	< 0.001	Si
C8-HSL vs. C6-HSL	23.437	< 0.001	Si
C8-HSL vs. C4-HSL	17.520	< 0.001	Si
C4-HSL vs. C7-HSL	7.643	< 0.001	Si
C4-HSL vs. C6-HSL	5.917	< 0.001	Si
C6-HSL vs. C7-HSL	1.727	0.285	No

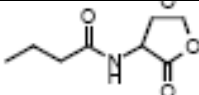
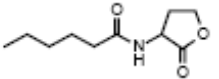
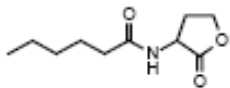
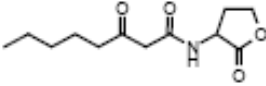
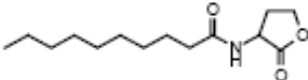
AHLs	Estructura	Actividad (%)
C4-HSL		190.3 (0.767)*
C6-HSL		100 (0.374)
C7-HSL		73.7 (1.748)
C8-HSL		457.6 (0.984)
C10-HSL		ND

Figura 21. Especificidad de la enzima AHL-lactonasa₁₇₋₁₁₅₁₆ por el sustrato. La actividad determinada con el sustrato C6-HSL ($6.554 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) fue definida como un 100 %. ND, indica actividad no determinada por poca solubilidad del sustrato. * Los datos en paréntesis muestran la desviación estándar de las mediciones realizadas por triplicado.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Existen varias publicaciones que muestran el potencial de la actividad enzimática de la AHL-lactonasa del gen *aiiA* de *B. thuringiensis* como estrategia para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos, pero es poca la información sobre la caracterización bioquímica de esta enzima inhibidora del quorum sensing. La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ de este estudio es una proteína de 250 aminoácidos que contiene el motivo “His¹⁰⁶-X-Asp¹⁰⁸-His¹⁰⁹-59X-His¹⁶⁹-21X-Asp¹⁹¹” y sólo se diferencia de la caracterizada por Kim et al. (2005) en el aminoácido valina en la posición 9 en vez de isoleucina (acceso a GeneBank AAM92140). Del mismo modo, difiere en dos aminoácidos en las posiciones 9 y 237 (valina e isoleucina respectivamente) en vez de isoleucina y treonina en la AHL-lactonasa_{240B1} estudiada bioquímicamente por Wang et al. (2004). Sin embargo, hasta ahora no hay investigaciones que reporten alguna importancia de estos aminoácidos en la actividad catalítica de la enzima, aunque existen diferencias entre las publicaciones de ambos grupos en aceptar si la AHL-lactonasa es una metaloenzima a pesar de tener sitios de unión para dos iones de zinc.

La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ tuvo un pH óptimo de 8.0 pero la actividad catalítica de ésta se redujo al disminuir el pH, aunque a pH 5.0 tuvo mejor actividad que la AHL-lactonasa_{240B1}. A diferencia de los resultados mostrados por Wang et al. (2004), los controles negativos a pH 9.0 evidenciaron una notable lactonólisis alcalina que posiblemente interfirió con la evaluación del desempeño de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ a este pH; consistente con lo observado en los bioensayos con la cepa reportera CV026. Esta alcalinización ha sido reportada por varios autores, e incluso hay observaciones de plantas que al ser atacadas por *E. carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) incrementan el pH en las zonas de infección para defenderse del atacante (Byers et al., 2002); pero la lactonólisis puede revertirse a pH ácidos (Camara et al., 2002). El comportamiento catalítico de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ a bajos pH es consistente con los resultados del análisis de dicroísmo circular realizado por Wang et al. (2004) los cuales muestran el drástico cambio de la estructura conformacional

de la enzima a bajos pH, además sugieren que el estado de ionización de las cadenas laterales y puentes de hidrógeno tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura conformacional de la proteína, de igual manera señalan que el rango de pH de 5.0 a 6.0 es el rango de ionización de la cadena lateral de las histidinas presentes en el sitio activo y esenciales para la actividad de la enzima (Wang et al., 2004).

La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ en presencia de C6-HSL exhibió estabilidad térmica a altas temperaturas, indicado por la actividad biológica que mostró a 40 y 50°C, 64 y 60 % respectivamente. Los resultados señalan que la enzima aumentó significativamente la velocidad de reacción y la frecuencia de colisiones entre moléculas de la enzima y la C6-HSL. Este comportamiento enzimático a altas temperaturas quizá puede superar la actividad la AHL-lactonasa_{240B1} ya que esta enzima quedó inactiva a 45°C (Wang et al., 2004). A pesar de conservar actividad biológica sobre su sustrato a altas temperaturas, ésta disminuyó a un 33% al incrementarse la temperatura a 50°C, mientras que a 70°C la actividad enzimática fue prácticamente nula. Este comportamiento revela una reducción de la velocidad de reacción, posiblemente a causa de la ruptura de los enlaces covalentes dentro de la enzima y a la desnaturalización de la misma. La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ tuvo su mayor actividad a 30°C concordando con la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo del que procede, *B. thuringiensis* y con los ensayos realizados con la cepa reportera *C. violaceum* CV026, aunque en los ensayos preliminares con CV026 se observó un 100% de actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ sobre C6-HSL en las mezclas de reacción incubadas hasta 60°C, esta hidrólisis posiblemente se produjo por el prolongado tiempo de incubación (120 minutos) de la enzima con su sustrato.

La actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ fue disminuida significativamente por todos los iones metálicos en las dos concentraciones evaluadas, pero el Cu²⁺ en las dos concentraciones evaluadas abolió completamente la funcionalidad biológica de la enzima sobre C6-HSL, posiblemente debido a la reacción de grupos sulfhidrilos de la enzima con el Cu²⁺. A diferencia de la AHL-lactonasa_{240B1}, que no fue inhibida por iones divalentes como Mg, Ca y Mn, la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ si lo estuvo y en varios de ellos como se muestra en la figura 20, ya que a concentraciones 2.0 mM de Mn²⁺ la actividad desapareció por

completo, aunque en los ensayos de las cepas reporteras con Mg^{2+} sólo se detectó una leve sombra alrededor del pozo indicando una buena actividad biológica. Es posible que esta inconsistencia sea debido a que el tiempo de reacción con las cepas reporteras fue hasta de dos horas, mientras que la cuantificación se realizó terminando la reacción de la enzima sobre C6-HSL a los 30 minutos. El efecto inhibitorio de Ca^{2+} y Mn^{2+} concuerda con lo observado con la cepa reportera CV026, aunque no hay literatura que explique el efecto del Mn^{2+} en la actividad AHL-lactonasa, si los hay sobre la desestabilización de un tipo de topoisomerasas causada por el Mn^{2+} (Sissi et al., 2005). Los experimentos con la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ con los iones Fe^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} mostraron el mismo comportamiento que la AHL-lactonasa_{240B1} y los ensayos con CV026 (Wang et al., 2004); es posible que el Fe^{2+} quizá tenga las mismas consecuencias que en la ureasa, en la que acelera la oxidación de grupos tioles (Tirrell y Middleman., 1978). Hasta ahora no hemos encontrado reportes del efecto de iones de K^+ y Al^{3+} en la actividad AHL-lactonasa. Es importante mencionar que en recientes estudios con paraoxonasas (PON1 y PON3) describen como los aminoácidos histidina, ácido aspártico, fenilalanina, entre otros, tienen la habilidad de unirse a metales, por esto se debe considerar que estos aminoácidos están reportados como esenciales en la actividad catalítica de las AHL-lactonasas, por ejemplo, el ácido aspártico (en las posiciones 50 y 108) y varias histidinas (en las posiciones 104, 106, 109, 169, y 235) están involucrados en la interacción con el anillo HSL, además de la coordinación y estabilización con el zinc. Del mismo modo la F^{107} participa en la unión de la cadena acilo en el canal hidrofóbico del sitio activo (Pla et al., 2007; Kim et al., 2005).

El agente quelante EDTA no afectó negativamente la actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ tanto en evaluaciones con el biosensor CV026 como en los ensayos de HPLC-MS, aunque se evaluaron concentraciones muy altas de este reactivo (10, 25 y 50 mM). Esto concuerda con el comportamiento de la AHL-lactonasa_{240B1}. La excelente actividad de la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ sobre el sustrato C6-HSL, aún en presencia de altas concentraciones de EDTA, es muy interesante porque a pesar de tener los mismo motivos propios de metaloenzimas, éstas se caracterizan por ser inhibidas por el agente quelante EDTA (Copeland, 2000, Bebrone, 2007), por lo tanto, permite inferir que a pesar de tener el

motivo catalítico $^{106}\text{HXDH}^{109}\sim\text{H}^{169}$ la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ posiblemente no es una metaloenzima, como lo han señalado Wang et al. (2004).

La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ mostró una gran afinidad por los sustratos, pero las constantes catalíticas y de eficacia fueron bajas comparadas con los resultados de Wang et al. (2004), aunque tuvo mejor afinidad por los sustratos evaluados que la AHL-lactonasa_{240B1}. Este comportamiento cinético puede explicarse por la baja concentración de sustrato usada en los ensayos, donde en la concentración más alta se encontraba en una relación milimolar 1:167 de enzima:sustrato, mientras que, en los experimentos de la AHL-lactonasa_{240B1} en una proporción 1:20.000. A pesar que la enzima demostró el mismo comportamiento propuesto por Michaelis-Menten para todos los sustratos, el no usar condiciones completamente saturantes de sustrato afecta la velocidad de la reacción y como consecuencia las constantes catalíticas y de eficacia, ya que se espera que la velocidad de la reacción sea proporcional a la concentración del complejo ES (enzima-sustrato); es decir, a bajas concentraciones de sustrato la concentración de ES podría ser directamente proporcional a la concentración de sustrato, mientras que a altas concentraciones de S, prácticamente toda la enzima podría estar presente en la forma del complejo ES y bajo estas condiciones la velocidad depende de la tasa de transformaciones químicas que convierten el complejo ES a EP (enzima-producto) y posteriormente liberar el producto para que la enzima quede disponible nuevamente y aunque se le añadiera más sustrato esto ya no afectaría la velocidad de la reacción (Copeland, 2000). También es importante señalar que además de la concentración del sustrato, nuestros experimentos de cinética se realizaron a 30°C mientras que los Wang et al. (2004) a 22 °C lo cual también pudo favorecer una mejor afinidad.

Los resultados encontrados con los ensayos de especificidad concuerdan con los parámetros cinéticos. Del mismo modo, comparado con los ensayos de Wang et al. (2004), la condición de saturación usada (1:6.000), fue superior a la nuestra; sin embargo, la especificidad por la C4-HSL ($12.47 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) superó a la actividad de $10.04 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ lograda por la AHL-lactonasa_{240B1}. Del mismo modo, la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ tuvo una actividad de $6.554 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ sobre C6-HSL, la cual representa un poco más de la mitad de la

actividad de la AHL-lactonasa_{240B1} con este mismo sustrato. Es importante señalar que se realizó un ensayo en las mismas condiciones de Wang et al. (2004) (saturación en una relación 1:6000) y se encontró que la actividad enzimática fue 31 veces mayor que la determinada en condiciones inferiores de saturación y superó significativamente la reportada para este sustrato por la AHL-lactonasa_{240B1}. Estos resultados sugieren que la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ además de tener mejor afinidad por los sustratos evaluados, también podría mostrar mejor comportamiento respecto a la constante catalítica y de eficacia. Esta última afirmación podría comprobarse o descartarse con nuevos experimentos en concentraciones de saturación mayores a las descritas en la metodología. Por otra parte, en la hidrólisis del sustrato C7-HSL la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ tuvo un comportamiento parecido al mostrado con C6-HSL, posiblemente por la similaridad del tamaño en la longitud de la cadena acilo, aunque hasta el momento no hay reportes que indiquen que este sustrato se produce en la naturaleza (Morin et al., 2003); en cambio, si los hay sobre la actividad de paraoxonasas con C7-HSL, lo cual indica que este sustrato es susceptible a la hidrólisis enzimática (Draganov et al., 2005). La alta actividad hidrolítica ($29.99 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ con C8-HSL es cuestionable, ya que este sustrato presentó muy poca solubilidad a la concentración evaluada y por lo tanto la cuantificación puede estar sesgada por la precipitación. Además, esto concuerda con los resultados observados con la cepa reportera NTL4 que detectó C8-HSL residual, mientras que con las mismas condiciones experimentales pero con el sustrato C6-HSL, el biosensor CV026 no indicó sustrato residual.

Los resultados experimentales del estudio de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆, la cual es estable a altas temperaturas y en condiciones de pH alcalino, además de tener afinidad por los diferentes sustratos evaluados, podría ser una herramienta viable y aplicable en la agricultura en cultivos que estén expuestos a condiciones ambientales similares y afectados por fitopatógenos que utilicen AHLs en su sistema de comunicación bacteriana.

9. CONCLUSIONES

La AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ recombinante del gen *aiiA* de *Bacillus thuringiensis*₁₄₇₋₁₁₅₁₆ es una enzima con actividad biológica sobre AHLs de diferentes longitudes de la cadena acilo y con mayor afinidad por sustratos de cadena corta. También es una enzima catalíticamente activa a altas temperaturas y en soluciones alcalinas, pero es inhibida por varios iones divalentes como Cu, Mn, Fe, Pb, Mg y Ca; del mismo modo por iones monovalentes (K) y trivalentes (Al).

La actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ no fue afectada por el agente quelante EDTA, lo que sugiere que quizá no hace parte de las metaloenzimas, a pesar de tener los motivos de unión a zinc en su secuencia peptídica.

AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ podría ser una enzima potencial para controlar fitopatógenos que utilicen AHLs en su sistema de comunicación celular, aun más si la cepa de *B. thuringiensis* de la que procede produce cristales involucrados en la toxicidad contra lepidópteros.

10. RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES

Evaluar la actividad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ usando mayores concentraciones de sustratos y menores intervalos de pH y temperatura y determinar la actividad lactonasa con soluciones de iones de zinc.

Desarrollar formulaciones con base en AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ o de la cepa *B. thuringiensis* que permitan disminuir la patogenicidad de fitopatógenos que afecten cultivos de interés agrícola.

Usar la enzima AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ para el desarrollo de productos farmacéuticos aplicable a humanos y animales para el control de infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas que hayan presentado resistencia al tratamiento con antibióticos.

Utilizar el gen *aihA* de la cepa de *B. thuringiensis* para el desarrollo de plantas modificadas genéticamente que expresen la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ para contrarrestar la comunicación de las células de patógenos y de esta forma interrumpir el proceso de virulencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C. 2002 Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiol.* 148: 2371–2381.
- Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C., and La Du, B. 2000. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug. Metab. Dispos.* 28: 1335–1342.
- Borchardt, S., Allain, E., Stearns, G., Kelly, R., and McCoy, W. 2001. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signalling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3174–3179.
- Bebrone. 2007. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharm.* 47 : 1686-1701.
- Byers, J., Lucas, C., Salmond, G., and Welch, M. 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J. Bacteriol.* 184: 1163-1171.
- Camara, M., Williams, P., and Hardman A. 2002. Controlling infection by turning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect. Dis.* 2: 667-676.
- Chun, C., Ozer, E., Welsh, M., Zabner, J., and Greenberg, E. 2004. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .101: 3587-3590.
- Copeland. 2000. Enzyme: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. 2nd Ed. pp 109-145. Wiley-VCH. New York.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., and Verstraete, W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture.* 240: 69-88.
- Dong, Y., Xu, J., Li, X., and Zhang, L. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 3526-3531.
- Dong, Y., Wang, L., Xu, J., Zhang, H., Zhang, X., and Zhang, L. 2001. Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813–817.

- Dong, Y., Gusti, A., Zhang, Q., Xu, J., and Zhang, L. 2002 Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1754–1759.
- Dong, Y., Zhang, X., Xu, J., Zhang, L. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 954-960.
- Dong, Y., and Zhang, L. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* 43: 101-109.
- Dong, Y., Wang, L., and Zhang, L. 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1201-1211.
- Draganov, D., and La Du, B. 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369: 78–88.
- Draganov, D., Teiber, J., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., and La Du, B. 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2 and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid. Res.* 46: 1239-1247.
- Fang, M., Wang, Y., Zhang, Y., Xiong, N., Yang, B., and Chen, S. 2009. Heterologous expression of human paraoxonases in *Pseudomonas aeruginosa* inhibits biofilm formation and decreases antibiotic resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:135–141.
- FAO, 2009. El estado de los mercados de los productos básicos agrícolas. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0854s/i0854s.pdf>
- Flagan, S., Ching, W., and Leadbetter, J. 2003. *Arthrobacter* strain VAIA-A utilizes acyl-homoserine lactone inactivation products and stimulates quorum signal biodegradation by *Variovorax paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 909-916.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukou, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, Ran., Dvir, H., Ravelli, R., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J., and Tawfik, D. 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 412–419.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T., Heydorn, A., Andersen, J., Parsek, M., Rice, S., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., and Givskov, M. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by halogenated furanone compound. *Microbiol.* 148: 87-102.
- Hoang, T., and Schweizer, H. 1999. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J. Bacteriol.* 181: 5489–5497.

- Hornby, J., Jensen, E., Lisec, A., Tasto, J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., and Nickersoni, K. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farsenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2982-2992.
- Huang, J., Han, J., Zhang, L., and Leadbetter, J. 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5941-5949.
- Huang, J., Petersen, A., Whiteley, M., and Leadbetter, J. 2006. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1190–1197.
- Khan, S., and Farrand, S. 2009. The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *J. Bacteriol.* 191: 1320–1329.
- Kim, M., Choi, W., Kang, H., Lee, J., Kang, B., Kim, K., Derewenda, Z., Oh, T., Lee, C., and Lee, J. 2005. The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum quenching N-acyl-l-homoserine lactone hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 17606–17611.
- Lazazzera, B., Solomon, J., and Grossman, A. 1997. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell.* 89: 917-925.
- Lazazzera, B., and Grossman, A. 1998. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol.* 6: 288-294.
- Lazazzera, B. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 177-182.
- Leadbetter, J., and Greenberg, E. 2000. Metabolism of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182:6921-6926.
- Lee, S., Park, S., Lee, J., Yum, D., Koo, B., and Lee, J. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3919-3924.
- Lin, Y., Xu, J., Hu, J., Wang, L., Ong, S., Leadbetter, J., and Zhang, L. 2003. Acyl - homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum–quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47: 849-860.
- Miller, M., and Bassler, B. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.

- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., and Défago, G. 2003. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 45: 71-81.
- Momb, J., Wang, C., Liu, D., Thomas, P., Petsko, G., Guo, H., Ringe, D., and Fast, W. 2008. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. substrate modeling and active site mutations. *Biochemistry.* 47: 7715-7725.
- Moré, M., Finger, L., Stryker, J., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272: 1655–1658
- Morin, D., Grasland, B., Vallée-Réhel, K., Dufau, C., and Haras, D. 2003. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr.* 1002: 79-92.
- Nealson, K., Platt, T., and Hastings, J. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104:313-322.
- Novick, R.P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48: 1429–1449.
- Oh, K., Miyazawa, H., Naito, T., and Matsuoka, H. 2001. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4664-4668.
- Ozer, E., Pezzulo, A., Shih, D., Chun, C., Furlong, C., Lusic, A., Greenberg, E., and Zabner, J. 2005. Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* 253: 29–37.
- Park, S., Lee, S., Oh, T., Oh, J., Koo, B., Yum, D., and Lee, J. 2003. AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology.* 149:1541–1550.
- Park, S., Kang, H., Jang, H., Lee, J., Koo, B., and Yum D. 2005. Identification of extracellular *N*-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2632-2641.
- Pearson, J., Van Delden, C., and Iglewski, B. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181: 1203–1210.

- Pla, A., Rodrigo, L., Hernández, A., Gil, F., and Lopez, O. 2007. Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver. *Chem. Biol. Interact.* 167: 63-70.
- Qin, N., Callahan, S., Dunlap, P., and Stevens, A. 2007. Analysis of LuxR regulon gene expression during quorum sensing in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 189: 4127-4134.
- Qin, Y., Luo, Z., Smyth, A., Gao, P., Beck von Bodman, S., and Farrand, S. 2000. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *EMBO J.* 19: 5212-5221.
- Rasmussen, T., and Givskov, M. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 149-161.
- Ravn, L., Christensen, A., Molin, S., Givskov, M., Gram, L. 2001. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J. Microbiol. Methods.* 44:239-251
- Schaefer, A., Val, D., Hanzelka, B., Cronan Jr, J., and Greenberg, E. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9505-9509.
- Schuster, M., Urbanowski, M., and Greenberg, E. 2004. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 15 833-15 839.
- Sissi, C., Marangon, E., Chemello, A., Noble, C., Maxwell, A., and Palumbo, M. 2005. The effects of metal ions on the structure and stability of the DNA gyrase B protein. *J. Mol. Biol.* 353: 1152-1160.
- Stephenson, K., Yamaguchi, Y., and Hoch, J. 2000 The mechanism of action of inhibitors of bacterial two component signal transduction systems. *J. Biol. Chem.* 275: 38 900-38 904.
- Thomas, P., Stone, E., Costello, A., Tierney, D., and Fast, W. 2005. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry* 44: 7559-7569.
- Tirrell, M., and Middleman, S. 1978. Shear deformation effects in enzyme catalysis metal ion effect in the shear inactivation of urease. *J. Biophys.* 23:121-128.
- Ulrich, R. L. 2004. Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6173-6180.
- Uroz, S., Oger, P., Chapelle, E., Adelinem, M., Fauer, D., and Dessaux, Y. 2008. A *Rhodococcus* qsd-A-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum quenching lactonases. *Appl. Environ. Micobiol.* 74: 1357-1366.

Wang, L., Weng, L., Dong, Y., and Zhang, L. 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorum quenching N-acyl homoserine lactonase (AHL-lactonase). *J. Biol. Chem.* 279: 13645-13651.

Waters, C., and Bassler, B. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21: 319-46.

Whitehead, N., Barnard, A., Slater, H., Simpson, N., and Salmond G. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W., and Cámara, M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1119-1134.

Xu, F., Byun, T., Deussen, H., and Duke, K. 2003. Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J. Biotechnol.* 101: 89-96.

Yang, F., Wang, L., Wang, J., Dong, Y., Hu, J., and Zhang, L. 2005. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett.* 579: 3713-3717.

Zhang, H., Wang, L., and Zhang L. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 4638-4643.

Zhang, H., Wang, C., and Zhang, L. 2004. The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* 52: 1389-1401.

Zhang, L., and Dong, Y. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53: 1563-1571.

Zhu, J., and Winans, S. 1999. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4832-4837.

ANEXO 1

Análisis estadístico de efecto de iones y agente quelante en la actividad AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆

Two Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook 1

General Linear Model

Dependent Variable: Col 3 = datos

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,105)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Col 1 = ion	9	7,375	0,819	236,133	<0,001
Col 2 = concentraciones	1	0,683	0,683	196,812	<0,001
Col 1 x Col 2	9	0,704	0,0782	22,539	<0,001
Residual	41	0,142	0,00347		
Total	60	8,968	0,149		

The difference in the mean values among the different levels of Col 1 is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Col 2. There is a statistically significant difference (P = <0,001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Col 2 is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Col 1. There is a statistically significant difference (P = <0,001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of Col 1 depends on what level of Col 2 is present. There is a statistically significant interaction between Col 1 and Col 2. (P = <0,001)

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 : 1,000

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 2 : 1,000

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 x Col 2 : 1,000

Least square means for Col 1 :

Group	Mean	SEM
Al	0,0694	0,0225
Cu	-2,637E-016	0,0240
Mn	0,149	0,0240
Fe	0,236	0,0240
Pb	0,555	0,0240
Mg	0,369	0,0240
Ca	0,395	0,0240
k	0,515	0,0240

PBS	1,065	0,0240
EDTA	1,020	0,0240

Least square means for Col 2 :

Group	Mean	SEM
0,2 mM	0,543	0,0108
2 mM	0,331	0,0106

Least square means for Col 1 x Col 2 :

Group	Mean	SEM
Al x 0,2 mM	0,139	0,0340
Al x 2 mM	-2,810E-016	0,0295
Cu x 0,2 mM	-3,018E-016	0,0340
Cu x 2 mM	-2,255E-016	0,0340
Mn x 0,2 mM	0,297	0,0340
Mn x 2 mM	-3,365E-016	0,0340
Fe x 0,2 mM	0,363	0,0340
Fe x 2 mM	0,108	0,0340
Pb x 0,2 mM	0,763	0,0340
Pb x 2 mM	0,347	0,0340
Mg x 0,2 mM	0,480	0,0340
Mg x 2 mM	0,259	0,0340
Ca x 0,2 mM	0,431	0,0340
Ca x 2 mM	0,359	0,0340
k x 0,2 mM	0,875	0,0340
k x 2 mM	0,155	0,0340
PBS x 0,2 mM	1,065	0,0340
PBS x 2 mM	1,065	0,0340
EDTA x 0,2 mM	1,020	0,0340
EDTA x 2 mM	1,020	0,0340

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Col 1**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
PBS vs. Cu	1,065	10	44,285	<0,001	Yes
PBS vs. Al	0,996	10	42,758	<0,001	Yes
PBS vs. Mn	0,916	10	38,105	<0,001	Yes
PBS vs. Fe	0,829	10	34,488	<0,001	Yes
PBS vs. Mg	0,696	10	28,921	<0,001	Yes
PBS vs. Ca	0,670	10	27,864	<0,001	Yes
PBS vs. k	0,550	10	22,864	<0,001	Yes
PBS vs. Pb	0,510	10	21,201	<0,001	Yes
PBS vs. EDTA	0,0454	10	1,888	0,939	No
EDTA vs. Cu	1,020	10	42,397	<0,001	Yes
EDTA vs. Al	0,950	10	40,808	<0,001	Yes
EDTA vs. Mn	0,871	10	36,217	<0,001	Yes
EDTA vs. Fe	0,784	10	32,600	<0,001	Yes
EDTA vs. Mg	0,650	10	27,033	<0,001	Yes
EDTA vs. Ca	0,625	10	25,975	<0,001	Yes
EDTA vs. k	0,504	10	20,976	<0,001	Yes

EDTA vs. Pb	0,464	10	19,313	<0,001	Yes
Pb vs. Cu	0,555	10	23,083	<0,001	Yes
Pb vs. Al	0,486	10	20,861	<0,001	Yes
Pb vs. Mn	0,407	10	16,904	<0,001	Yes
Pb vs. Fe	0,320	10	13,287	<0,001	Yes
Pb vs. Mg	0,186	10	7,720	<0,001	Yes
Pb vs. Ca	0,160	10	6,662	0,001	Yes
Pb vs. k	0,0400	10	1,663	0,972	No
k vs. Cu	0,515	10	21,421	<0,001	Yes
k vs. Al	0,446	10	19,144	<0,001	Yes
k vs. Mn	0,367	10	15,241	<0,001	Yes
k vs. Fe	0,280	10	11,624	<0,001	Yes
k vs. Mg	0,146	10	6,057	0,004	Yes
k vs. Ca	0,120	10	5,000	0,031	Yes
Ca vs. Cu	0,395	10	16,421	<0,001	Yes
Ca vs. Al	0,326	10	13,981	<0,001	Yes
Ca vs. Mn	0,246	10	10,242	<0,001	Yes
Ca vs. Fe	0,159	10	6,624	0,001	Yes
Ca vs. Mg	0,0254	10	1,058	0,999	No
Mg vs. Cu	0,369	10	15,364	<0,001	Yes
Mg vs. Al	0,300	10	12,888	<0,001	Yes
Mg vs. Mn	0,221	10	9,184	<0,001	Yes
Mg vs. Fe	0,134	10	5,567	0,010	Yes
Fe vs. Cu	0,236	10	9,797	<0,001	Yes
Fe vs. Al	0,166	10	7,139	<0,001	Yes
Fe vs. Mn	0,0870	10	3,617	0,270	No
Mn vs. Cu	0,149	10	6,180	0,003	Yes
Mn vs. Al	0,0792	10	3,403	0,349	No
Al vs. Cu	0,0694	10	2,979	0,534	No

Comparisons for factor: **Col 2**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
0,2 mM vs. 2 mM	0,212	2	19,840	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Col 2 within Al**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2 mM	0,139	2	4,361	0,004	Yes

Comparisons for factor: **Col 2 within Cu**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
2 mM vs. 0,2 mM	7,633E-017	2	2,244E-015	1,000	No

Comparisons for factor: **Col 2 within Mn**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2 mM	0,297	2	8,739	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Col 2 within Fe**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
-------------------	----------------------	----------	----------	----------	------------------

0,2 mM vs. 2 mM	0,255	2	7,497	<0,001	Yes
-----------------	-------	---	-------	--------	-----

Comparisons for factor: **Col 2 within Pb**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2 mM	0,416	2	12,217	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Col 2 within Mg**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2 mM	0,221	2	6,513	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Col 2 within Ca**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2 mM	0,0717	2	2,107	0,144	No

Comparisons for factor: **Col 2 within k**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2 mM	0,720	2	21,176	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Col 2 within PBS**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2 mM	0,000605	2	0,0178	0,990	No

Comparisons for factor: **Col 2 within EDTA**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,2 mM vs. 2mM	0,000	2	0,000	1,000	No

Comparisons for factor: **Col 1 within 0,2 mM**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
PBS vs. Cu	1,065	10	31,323	<0,001	Yes
PBS vs. Al	0,927	10	27,244	<0,001	Yes
PBS vs. Mn	0,768	10	22,584	<0,001	Yes
PBS vs. Fe	0,702	10	20,647	<0,001	Yes
PBS vs. Ca	0,635	10	18,658	<0,001	Yes
PBS vs. Mg	0,585	10	17,203	<0,001	Yes
PBS vs. Pb	0,302	10	8,892	<0,001	Yes
PBS vs. k	0,190	10	5,588	0,010	Yes
PBS vs. EDTA	0,0457	10	1,344	0,994	No
EDTA vs. Cu	1,020	10	29,979	<0,001	Yes
EDTA vs. Al	0,881	10	25,900	<0,001	Yes
EDTA vs. Mn	0,722	10	21,240	<0,001	Yes
EDTA vs. Fe	0,657	10	19,303	<0,001	Yes
EDTA vs. Ca	0,589	10	17,314	<0,001	Yes
EDTA vs. Mg	0,539	10	15,859	<0,001	Yes
EDTA vs. Pb	0,257	10	7,548	<0,001	Yes
EDTA vs. k	0,144	10	4,244	0,111	No
k vs. Cu	0,875	10	25,735	<0,001	Yes
k vs. Al	0,737	10	21,655	<0,001	Yes

k vs. Mn	0,578	10	16,995	<0,001	Yes
k vs. Fe	0,512	10	15,059	<0,001	Yes
k vs. Ca	0,445	10	13,070	<0,001	Yes
k vs. Mg	0,395	10	11,615	<0,001	Yes
k vs. Pb	0,112	10	3,304	0,389	No
Pb vs. Cu	0,763	10	22,431	<0,001	Yes
Pb vs. Al	0,624	10	18,352	<0,001	Yes
Pb vs. Mn	0,466	10	13,692	<0,001	Yes
Pb vs. Fe	0,400	10	11,755	<0,001	Yes
Pb vs. Ca	0,332	10	9,766	<0,001	Yes
Pb vs. Mg	0,283	10	8,311	<0,001	Yes
Mg vs. Cu	0,480	10	14,120	<0,001	Yes
Mg vs. Al	0,341	10	10,041	<0,001	Yes
Mg vs. Mn	0,183	10	5,381	0,015	Yes
Mg vs. Fe	0,117	10	3,444	0,333	No
Mg vs. Ca	0,0495	10	1,455	0,989	Do Not Test
Ca vs. Cu	0,431	10	12,665	<0,001	Yes
Ca vs. Al	0,292	10	8,586	<0,001	Yes
Ca vs. Mn	0,134	10	3,926	0,179	No
Ca vs. Fe	0,0677	10	1,989	0,918	Do Not Test
Fe vs. Cu	0,363	10	10,676	<0,001	Yes
Fe vs. Al	0,224	10	6,597	0,001	Yes
Fe vs. Mn	0,0659	10	1,937	0,930	Do Not Test
Mn vs. Cu	0,297	10	8,739	<0,001	Yes
Mn vs. Al	0,158	10	4,660	0,056	No
Al vs. Cu	0,139	10	4,079	0,143	No

Comparisons for factor: **Col 1 within 2 mM**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
PBS vs. Mn	1,065	10	31,305	<0,001	Yes
PBS vs. Al	1,065	10	33,467	<0,001	Yes
PBS vs. Cu	1,065	10	31,305	<0,001	Yes
PBS vs. Fe	0,957	10	28,126	<0,001	Yes
PBS vs. k	0,910	10	26,746	<0,001	Yes
PBS vs. Mg	0,806	10	23,698	<0,001	Yes
PBS vs. Pb	0,717	10	21,091	<0,001	Yes
PBS vs. Ca	0,706	10	20,747	<0,001	Yes
PBS vs. EDTA	0,0451	10	1,326	0,994	No
EDTA vs. Mn	1,020	10	29,979	<0,001	Yes
EDTA vs. Al	1,020	10	32,049	<0,001	Yes
EDTA vs. Cu	1,020	10	29,979	<0,001	Yes
EDTA vs. Fe	0,911	10	26,800	<0,001	Yes
EDTA vs. k	0,865	10	25,420	<0,001	Yes
EDTA vs. Mg	0,761	10	22,371	<0,001	Yes
EDTA vs. Pb	0,672	10	19,765	<0,001	Yes
EDTA vs. Ca	0,661	10	19,421	<0,001	Yes
Ca vs. Mn	0,359	10	10,558	<0,001	Yes
Ca vs. Al	0,359	10	11,287	<0,001	Yes
Ca vs. Cu	0,359	10	10,558	<0,001	Yes
Ca vs. Fe	0,251	10	7,379	<0,001	Yes
Ca vs. k	0,204	10	5,999	0,004	Yes
Ca vs. Mg	0,100	10	2,950	0,547	No
Ca vs. Pb	0,0117	10	0,344	1,000	Do Not Test
Pb vs. Mn	0,347	10	10,214	<0,001	Yes
Pb vs. Al	0,347	10	10,919	<0,001	Yes

Pb vs. Cu	0,347	10	10,214	<0,001	Yes
Pb vs. Fe	0,239	10	7,035	<0,001	Yes
Pb vs. k	0,192	10	5,655	0,009	Yes
Pb vs. Mg	0,0886	10	2,606	0,705	Do Not Test
Mg vs. Mn	0,259	10	7,607	<0,001	Yes
Mg vs. Al	0,259	10	8,133	<0,001	Yes
Mg vs. Cu	0,259	10	7,607	<0,001	Yes
Mg vs. Fe	0,151	10	4,429	0,083	No
Mg vs. k	0,104	10	3,048	0,502	Do Not Test
k vs. Mn	0,155	10	4,559	0,067	No
k vs. Al	0,155	10	4,874	0,039	Do Not Test
k vs. Cu	0,155	10	4,559	0,067	Do Not Test
k vs. Fe	0,0469	10	1,380	0,992	Do Not Test
Fe vs. Mn	0,108	10	3,179	0,443	Do Not Test
Fe vs. Al	0,108	10	3,398	0,350	Do Not Test
Fe vs. Cu	0,108	10	3,179	0,443	Do Not Test
Cu vs. Mn	1,110E-016	10	3,264E-015	1,000	Do Not Test
Cu vs. Al	5,551E-017	10	1,745E-015	1,000	Do Not Test
Al vs. Mn	5,551E-017	10	1,745E-015	1,000	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

ANEXO 2

Análisis estadístico de especificidad de la AHL-lactonasa₁₄₇₋₁₁₅₁₆ por el sustrato.

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook 1

Normality Test: Passed (P = 0,435)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,192)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C4-HSL	3	0	12,470	0,767	0,443
C6-HSL	3	0	6,554	0,374	0,216
C7-HSL	3	0	4,827	1,748	1,009
C8-HSL	3	0	29,990	0,984	0,568

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	1189,371	396,457	333,704	<0,001
Residual	8	9,504	1,188		
Total	11	1198,875			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
C8-HSL vs. C7-HSL	25,163	4	39,986	<0,001	Yes
C8-HSL vs. C6-HSL	23,437	4	37,243	<0,001	Yes
C8-HSL vs. C4-HSL	17,520	4	27,841	<0,001	Yes
C4-HSL vs. C7-HSL	7,643	4	12,145	<0,001	Yes
C4-HSL vs. C6-HSL	5,917	4	9,402	<0,001	Yes
C6-HSL vs. C7-HSL	1,727	4	2,744	0,285	No