



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Caracterización de un biosensor de acil-homoserina lactona dependiente de *luxR* en la bacteria *Escherichia Coli***

**Caracterización dun biosensor de acil-homoserina lactona dependente de *luxR* na bacteria *Escherichia Coli***  
**Characterization of a *luxR*-dependent biosensor of acyl-homoserine lactone in *Escherichia Coli***

**Alejandro Novoa Pello**

**Curso: 2022 - 2023.**

**Convocatoria: Julio**

*Director/a: Antón Vila Sanjurjo*

<b>Índice</b>	<b>2</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>4</b>
1.1. <i>Quorum sensing</i>	4
1.2. Operon <i>lux</i>	4
1.3. <i>LuxI</i>	6
1.4. <i>LuxR</i>	6
1.5. Autoinductores	7
1.6. Biosensor en <i>E. Coli</i>	8
1.7. GFP	8
1.8. Inhibidor	9
<b>2. Objetivos</b>	<b>9</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>10</b>
3.1. Plásmido	10
3.2. Medios de cultivo	10
3.3. Antibiótico	11
3.4. Fluorescencia	11
3.5. Autoinductor	11
3.6. Inhibidor	11
3.7. Preparación del biosensor	12
3.8. Estudio de fluorescencia	13
<b>4. Resultados</b>	<b>15</b>
4.1. Estudio de fluorescencia	14
4.2. Recreación del plásmido	16
4.3. Clonaje en un vector de bajo número de copias	17
<b>5. Conclusión</b>	<b>21</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>22</b>

## **Resumen**

El estudio del QS es un campo muy estudiado desde su primera descripción en *V. fischeri* en los años 70. Desde entonces se han conocido cada vez más conceptos y elementos relacionados con su funcionamiento. En este estudio vamos a comprobar cómo funciona un biosensor capaz de detectar AHL exógenas mediante un gen de *luxR* sobreexpresado y reportar la detección mediante GFP en forma de fluorescencia. Al mismo tiempo, vamos a comprobar cómo reacciona el biosensor ante un inhibidor con capacidad antagonista como es el CA. Los experimentos realizados muestran que el biosensor responde positivamente ante las AHL exógenas y se produce una inhibición en presencia de CA. Estos resultados pueden ser interesantes para la creación de nuevos biosensores para otros tipos de autoinductores de bacterias que son patógenas para el ser humano.

## **Resumo**

O estudo do QS é un campo moi estudado dende a súa primeira descrición en *V. fischeri* nos anos 70. Dende entón coñecéronse cada vez máis conceptos e elementos relacionados co seu funcionamento. Neste estudo imos comprobar como reacciona o biosensor capaz de detectar AHL externas mediante un xen sobre expresado de *luxR* e reportar a súa detección mediante GFP en forma de fluorescencia. O mesmo tempo comprobaremos como reacciona fronte a un inhibidor con capacidade antagonista como é o CA. Os experimentos realizados mostran que o biosensor responde positivamente ante as AHL externas e que se produce unha inhibición en presenza do CA. Estes resultados poden ser interesantes para a creación de novos biosensores para outros tipos de auto indutores de bacterias que poden ser patóxenas para o ser humano.

## **Resume**

QS studies are a field widely known since it's first description in the 70s in *V. fischeri*. Since then, more and more concepts and other elements related to its operation become known. In this study we are going to test the operation of a biosensor capable of detecting exogenous AHL using a *luxR* overexpressed gene that reports the information with a GFP gene. At the same time, we are going to do the same test using an antagonistic inhibitor, the CA. The results show that the biosensor operates with a positive response in the presence of AHL and shows a inhibition with CA. These results could be interesting to create new biosensors to detect other autoinducers existent in pathological bacteria.

**Palabras clave:** *quorum sensing*, *V. fischeri*, acil-homoserina lactona, cinamaldehído, biosensor

## **1. Introducción.**

### **1.1 Quorum sensing.**

Antiguamente se creía que las bacterias se comportaban como individuos separados y que no establecían relaciones grupales como un ente multicelular. El descubrimiento del *Quorum sensing* (QS) en *Vibrio fischeri* en los años 70 (Eberhard, 1972) ha dado lugar a una gran cantidad de investigaciones relacionadas con el tema, debido a las posibilidades que conlleva el hecho de que las bacterias puedan emprender acciones coordinadas, como migrar a ambientes más propicios para el crecimiento, formar biopelículas o incluso protegerse en ambientes con condiciones adversas. Actualmente la mayoría de los microorganismos conocidos capaces de utilizar QS están asociados de alguna forma a otros organismos de beneficiosa en forma de simbiosis o perjudicial en forma de patógenos como, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* o *Streptococcus pneumoniae* (Kievit, 2000, Jayaraman, 2008).

QS se puede definir como la comunicación que tiene lugar entre bacterias en un ambiente determinado. Dicha comunicación se produce mediante unas moléculas denominadas autoinductores (AI), que son segregadas al medio en base a la densidad celular. En el modelo actual de QS cuando los AI alcanzan una concentración límite se empiezan a acumular en el citoplasma bacteriano y comienza a iniciarse la activación de los genes implicados en las respuestas. Sin embargo, *in vivo* no es tan sencillo conocer las interacciones debido a que entran en juego múltiples factores distintos. (Vila, 2016). QS permite a las bacterias alternar entre dos sistemas de expresión genética: uno correspondiente a bajas densidades celulares, cuando el número de individuos está por debajo del umbral de densidad celular en el cual realizan sus funciones individualmente; y otro correspondiente a altas densidades celulares, cuando el número de individuos supera el umbral tras el que comienzan a realizar funciones para las que es necesario el QS (NG, 2009).

El organismo principal de estudio del proceso de QS son las bacterias Gram negativas como *E. Coli*, aunque el organismo inicial en el que se ha estudiado este fenómeno es *Vibrio fischeri*. Esta bacteria coloniza el órgano luminoso del calamar *Euprymna scolopes*. El ambiente altamente propicio para el crecimiento en el interior de dicho órgano permite a la bacteria alcanzar una gran densidad celular que permite la acumulación del AI N-3-oxohexanoil-homoserina lactona (AHL), que estimula el QS en la población bacteriana. En el interior del órgano luminoso las bacterias pueden alcanzar densidades de aproximadamente 1000 células por mL, una cantidad muy superior a la que se encuentra en el exterior siendo ésta de solo unas 100 células por mL (Fuqua, 1996).

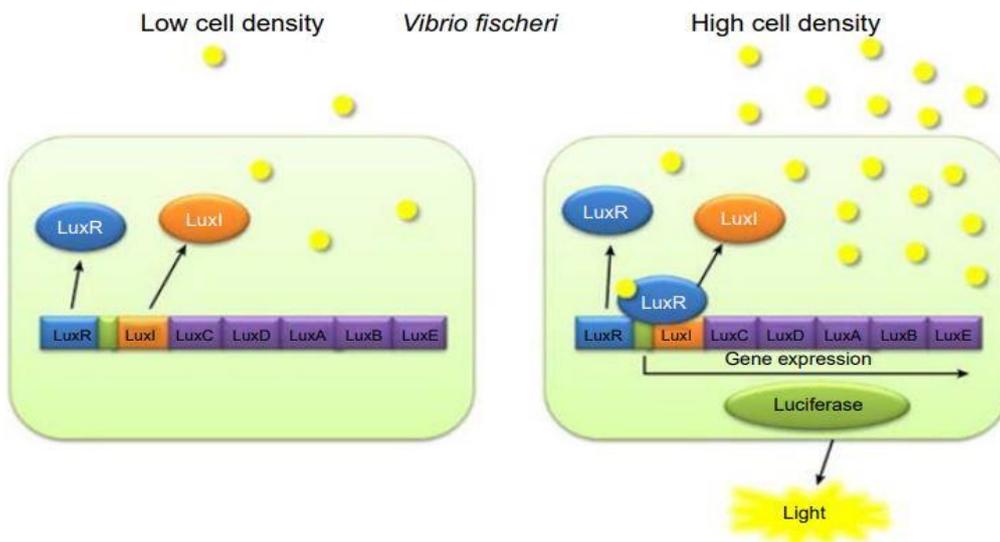
### **1.2. Operón lux.**

El operón *lux* de *V. fischeri*, implicado en el QS, está conformado por los genes *luxI*, *luxD*, *luxA*, *luxB* y *luxE*; además de el gen *luxR* y la *lux* box. Los genes *luxA* y *luxB* se encargan de la síntesis de las subunidades de la luciferasa. Los genes *luxC*, *luxD* y *luxE* se encargan de la síntesis del complejo reductasa de ácidos grasos, enzima que recicla

el sustrato aldehído de la luciferasa. El gen *luxR* se encarga de la síntesis del receptor de AHL del mismo nombre (NG, 2009). La *lux box* es una región localizada corriente arriba del gen *luxR*, donde se encuentran las secuencias de unión del receptor *luxR*. Cuando *V. fischeri* llega a una densidad celular crítica se comienzan a acumular las moléculas de AI en el interior de la pared celular y se unen a *luxR*, que sufre un cambio conformacional que le permite unirse a la secuencia consenso de la *lux box* iniciando la cascada de transcripciones de los genes del operón *lux* incluidos los que codifican la síntesis de la luciferasa produciendo la bioluminiscencia característica de *E. scolopes* que emplea para su supervivencia cerca del lecho marino al eliminar la formación de sombras en un proceso denominado contrailuminación que evita ser detectado por sus depredadores (NG, 2009).

Los componentes del operón *lux* que presentan homologías han evolucionado de forma independiente, sobre todo cuando estudiamos sus regiones conservadas. En el caso de LuxI existen similitudes en la secuencia de aproximadamente un 35%, mientras que para LuxR el valor es aún menor, sobre un 25%. Para poder realizar estos estudios se han realizado búsquedas de nuevas especies capaces de realizar el QS mediante la producción de AI empleando un biosensor similar al que usamos en este estudio con ayuda de una cepa de *E. Coli* auxotrófica de LuxI para detectar AI específicos (Fuqua, 1996).

El proceso de QS en *V. fischeri* está regulado por dos proteínas, *luxI* y *luxR*. (Schaefer, 1996), de las que existen multitud de homólogos en otras especies. (Azimi, 2020) Así, muchas bacterias Gram negativas utilizan sistemas QS basados en biosensores compuestos de un productor de AI, equivalente a *luxI* y de un receptor de AI, equivalente a *luxR*, que regulan toda una serie de procesos biológicos de interés, como la virulencia, formación de biofilms, fluorescencia, etc. (Vila, 2016).



**Figura 1.** Esquema de QS en *V. fischeri*. A una densidad celular baja la concentración de AHL no será suficiente para activar el QS. Cuando la densidad celular es alta AHL se acumula, se une a *LuxR* y se activa la cascada de transcripciones del operón *lux* (Hadla, 2018).

### 1.3. LuxI

LuxI es una proteína que tiene función de sintasa para producir el AI necesario para la comunicación intercelular. Estudios realizados *in vitro* con extractos crudos celulares de *V. fischeri* confirman que la síntesis se realiza con S-adenosilmetionina (SAM) y 3-oxohexanoilcoenzima A (CoA) como sustratos dando lugar a la molécula de AHL. (Fuqua, 1996; Schaefer, 1996). La reacción de síntesis tiene lugar mediante una serie de reacciones de acilación y lactonización entre SAM y el hexanoil-ACP. Una vez sintetizado, el AHL difunde al exterior de la célula. (NG, 2009). A niveles basales de densidad celular habrá una concentración de LuxI presente en el medio similar a la externa debido a la permeabilidad de la pared celular a los AI, que son expulsados al exterior tanto por difusión pasiva como activa. A medida que aumente la densidad celular la cantidad de LuxI irá aumentando en respuesta a la cantidad de AHL que se acumula mediante un proceso de retroalimentación positiva en el que interviene *LuxR*. (Jayaraman, 2008).

#### **1.4. LuxR**

LuxR regula la transcripción de los genes en el operón *lux*. En estado basal se encuentra en estado monomérico. Tanto LuxR como sus homólogos están compuestos generalmente por dos regiones. En la primera se encuentra el extremo carboxilo o C que contiene una región de 19 aminoácidos con un motivo hélice-giro-hélice con una secuencia altamente conservada cuya función es unirse a secuencias específicas promotoras de ADN que se localizan en la *lux* box (Choi, 1991). En la segunda se encuentra el extremo amino o N encargado de impedir la unión del extremo C y el ADN si no se encuentra un AI unido al receptor, lo que anula su capacidad inhibitoria. (Fuqua, 1996; Hanzelka, 1995).

Cuando la concentración de AHL es baja, LuxR es altamente inestable y se degrada con rapidez. (NG, 2009). Cuando la concentración de AHL es lo suficientemente elevada se une al extremo N de este dímero y provoca un cambio conformacional en el que se forma un multímero dejando expuesto el extremo C, una región de unión a ADN específica de la secuencia consenso de la *lux* box (Azimi, 2020; Jayaraman, 2008), lo que permite que el complejo *LuxR-AHL* se una a la *lux* box. Ésta secuencia se encuentra corriente arriba del operon *lux* y la unión del complejo *LuxR-AHL* activa la transcripción de los genes *lux*. (NG, 2009). La unión de LuxR a la *lux* box no solo regula los genes *lux* corriente abajo que codifican para la luciferasa sino que a su vez regulan la expresión del gen *LuxI*, aumentando en gran medida la producción de esta enzima en un proceso de retroalimentación positiva. Al mismo tiempo, el crecimiento de la producción de *LuxI* y de AHL conlleva otro proceso de retroalimentación negativa debido a que la enzima LuxR activada regula negativamente la producción de más LuxR. Todo este proceso lleva a que la respuesta del QS no se mantenga durante grandes cantidades de tiempo. (Jayaraman, 2008).

#### **1.5. Autoinductores**

Los AI son moléculas pequeñas con alta capacidad de difusión que son producidas por *LuxI* u homólogos como se ha mencionado anteriormente. Siguiendo el modelo establecido en *V. fischeri* que emplea N-3-(oxohexanoyl)homoserina lactona, un tipo de acil-homoserina lactona o AHL como señal (Fuqua, 2001), dichas AHL están compuestas por un anillo homoserina lactona con cadenas aciles laterales. Han sido estudiados durante mucho tiempo desde el descubrimiento de *V. fischeri*, con la colonización del órgano luminoso de *E. scolopes* (Azimi, 2020), siendo éste el primer AI descubierto y descrito. (Fuqua, 1996) Actúan como el lenguaje que emplean las bacterias para comunicarse entre ellas. (NG, 2009).

Previamente a la activación del QS la concentración de AI es directamente proporcional a la densidad celular. Cuando la concentración es demasiado baja no es posible detectarlos. Al llegar a unos niveles de densidad celular lo suficientemente elevados las bacterias pueden detectar dichas variaciones de la concentración de AI como la señal a partir de la cual empezar a activar o reprimir genes. (Fuqua, 1996; Kievit, 2000). Una vez iniciado el proceso QS es necesario continuar la producción de AI por lo que entra en acción un circuito de retroalimentación positiva que aumenta la concentración de AI haciendo que las células pasen de un estado basal de baja densidad a uno de alta densidad. (NG; Bassler, 2009)

Por regla general las moléculas de AI solo pueden unirse a su receptor específico Cada homólogo de LuxR puede reconocer y unirse a una serie de AI, aumentando la diversidad de relaciones entre especies bacterianas. (Azimi, 2020). El rasgo característico que diferencia las moléculas de AHL, el AI más común en las bacterias Gram negativas, es la cadena acil. Dicha cadena puede variar en longitud desde los 4 hasta los 18 carbonos además de poder poseer una gran cantidad de grupos sustitutivos, incluyendo insaturaciones. (Kievit, 2000) A pesar de que los receptores de AI son extremadamente sensibles a sus AI específicos, puede haber ciertos AI que provocan la formación de complejos con receptores heterólogos, aunque esto ocurre a concentraciones muy superiores a las requeridas para su receptor habitual (Kievit, 2000; Jayaraman, 2008).

## **1.6. Biosensor en *E.coli***

La cepa que vamos a emplear en este estudio es una cepa Top10 de *E. coli*, un bacilo Gram negativo que es utilizado ampliamente por su estatus de organismo modelo. Su uso permite un crecimiento de cepas rápido y sencillo sin muchos requisitos.

Para medir la presencia de AHL en el medio, utilizaremos un biosensor específico para su detección. Los biosensores de QS son normalmente bacterias recombinantes que contienen un gen codificante de un receptor de QS, acoplado a un gen reportero que dará una señal en presencia del AI o AIs a los que responde el receptor. En este caso el biosensor llevará el gen *luxR* en un plásmido de alto número de copia, desde el que se expresará de forma constitutiva, de modo que, en presencia de AHL, permitirá la síntesis de la proteína proteína fluorescente verde (GFP), que actuará como señal visual. (Vila, 2016; Ziegler, 1998).

## **1.7. GFP**

La proteína fluorescente verde o *green fluorescent protein* en inglés, de ahí las siglas que la nombran GFP, es una proteína de aprox. 238 aminoácidos de longitud que absorbe luz entre 395-470 nm y emite luz verde entre 510-540 nm. Desde su descubrimiento en *Aqueorea victoria* a principios de los 60, han sido localizados genes que codifican la síntesis en varios organismos. Como la síntesis de GFP para producir fluorescencia no es un proceso muy conservado, los métodos para la producción de esta proteína difieren entre organismos. (Chalfie, 1994; Zimmer, 2002).

El proceso biológico que conlleva su síntesis en *A. victoria* tiene lugar mediante la oxidación de la coelentraxina o luciferina, que actúa como sustrato, mediante la acción de la enzima luciferasa. Todo esto tiene lugar en un ambiente aerobio ya que el oxígeno es el agente oxidante. La luciferasa une tres iones de calcio a la luciferina en este proceso de oxidación resultando en un complejo capaz de emitir luz azul tras lo que recibe una transferencia energética convirtiéndola en GFP siendo capaz a partir de este momento de emitir luz verde tras ser estimulada mediante luz azul. El cromóforo está compuesto por una molécula de serina-tiroxina-glicina sintetizada mediante una reacción autocatalítica de oxidación como el proceso anteriormente mencionado para la síntesis del resto de GFP. (Zimmer, 2002).

Estructuralmente GFP está compuesta por once láminas  $\beta$  formando una especie de barril rodeando un cromóforo incluido en otra hélice  $\alpha$  que recorre el interior, protegido de la oxidación y ataques de otros iones. Esta estructura es fundamental para el funcionamiento y estabilidad de GFP. Cuando se desnaturaliza la proteína pierde toda su capacidad de producir fluorescencia. (Tsien, 1998)

GFP es usada como marcador o reportero gracias a su fluorescencia altamente estable, a que no requiere de agentes externos para sintetizarse y que la unión de GFP a otras proteínas no altera su función. Debido a estos factores, el uso de GFP como marcador se ha extendido para el estudio de múltiples procesos biológicos como el que trata este trabajo. (Chalfie, 1994).

### **1.8. Inhibidor.**

El inhibidor de QS empleado en este estudio es el trans-cinamaldehído, un aceite esencial obtenido de la canela que se puede encontrar como saborizante en alimentos o como fungicida. Está compuesto por un anillo fenilo unido a una cola aldehído. Su estructura es muy similar a la del AI que utilizamos para este estudio, lo que le confiere una capacidad de inhibir el QS de nuestra cepa mediante la competición o antagonismo por el receptor LuxR. (Visvalingam, 2013)

Se conoce la capacidad de inhibir el crecimiento que posee el cinamaldehído en *E. Coli*. Sin embargo, las concentraciones que vamos a utilizar no van a ser lo suficientemente altas como para que se produzca una inhibición del crecimiento significativa. (Qin, 2020; Yossa, 2011)

## **2. Objetivos.**

1) Comprobación y verificación del funcionamiento de un proceso de detección de AHL exógenas por parte de un biosensor diseñado para realizar ese cometido. Para estudios futuros a realizarse en el laboratorio AVS, es necesario poner a punto este biosensor, para lo cual se tratará de repetir los experimentos realizados con el mismo en trabajos anteriores (Vila, 2021)

En la primera parte del estudio se realizará la verificación del proceso de detección mediante una serie de experimentos en los que añadiremos AHL exógenas a diferentes concentraciones para establecer una concentración mínima a la que se produce la estimulación necesaria para producir GFP dando una respuesta bioluminiscente.

En la segunda parte realizaremos los mismos experimentos. Sin embargo, se realizarán a una única concentración de AHL, que será la que ofrezca un rango de acción adecuado para la visualización de la inhibición producida por el cinamaldehído. Con esa concentración de AHL, establecida en los experimentos anteriores, iremos añadiendo diferentes concentraciones de cinamaldehído, para observar el grado de inhibición obtenido.

2) Creación de un biosensor con bajos niveles de producción de LuxR. El biosensor utilizado en 1) lleva el gen *luxR* en un plásmido con alto número de copia. En la tesis de Celina Vila Sanjurjo se había hipotetizado sobre las consecuencias de la presencia de niveles muy altos de LuxR en este biosensor y se proponía reemplazarlo por un sistema de copia única. El esquema de clonaje para hacer este constructo se presenta en este trabajo.

### **3. Material y métodos.**

#### **3.1. Plásmido.**

Como se ha dicho, el plásmido empleado denominado pSB1A3-Bba\_T9002, posee un alto número de copias. El plásmido se halla en la cepa Top10 de *E.coli* y está compuesto por un gen de resistencia a la ampicilina, un gen *luxR*, una secuencia de unión de LuxR (correspondiente al promotor de *luxI*) acoplada al gen que codifica GFP. (Vila, 2021)

#### **3.2. Medios de cultivo.**

El medio de cultivo empleado ha sido el medio Luria-Bertani o LB. Este es un medio general que contiene lo necesario para hacer crecer cualquier cepa que necesitemos de una forma rápida y sencilla. En el caso de las placas de medio en las que realizaremos las primeras siembras es un medio LB (Miller) de Scharlau© y en el caso de los tubos de cultivo líquido posteriores emplearemos un medio LB (Lennox) de Condalab©.

**Tabla 1.** Composición detallada de los medios de cultivo.

Medio LB sólido	Medio LB líquido
NaCl 15 g/L Tryptona 5 g/L Extracto levadura 10 g/L	NaCl 10 g/L Tryptona 10 g/L Extracto levadura 5 g/L

El medio LB sólido utilizado se ha preparado siguiendo las indicaciones del fabricante. (Atlas, 2010) Preparamos 500 mL de agua tipo II en un matraz en el que disolveremos 17,5 g de medio en polvo. Agitamos hasta que se disuelva totalmente y lo llevamos al autoclave donde lo someteremos a un programa de 121°C durante 30 min. En cuanto se enfría echamos la ampicilina siguiendo una proporción 1/1000 que emplearemos cada vez que preparemos medio. Al terminar vertemos el contenido del matraz en las placas en una campana de flujo y dejamos secar. Etiquetamos y llevamos a la cámara frigorífica para su conservación.

El medio LB líquido se ha preparado siguiendo el mismo método que se ha empleado para la fabricación del medio sólido. (Atlas, 2010) Hemos pesado 25 g de medio en polvo según las indicaciones del fabricante y lo hemos disuelto en 1 L de agua tipo II. Lo pasamos por el autoclave con el mismo programa tras verter el medio en botellas. Una vez enfriado sellamos las botellas y guardamos hasta su próximo uso.

### **3.3. Antibiótico.**

Como el plásmido empleado para el estudio tiene un gen de resistencia a la ampicilina, entonces emplearemos ampicilina para mantener una presión selectiva como se ha comentado anteriormente en la descripción del plásmido.

Para prepararla, partiremos de un stock de PamReac AppliChem© del cual realizaremos una dilución 200 mg/mL que usaremos en la preparación de placas y de los cultivos líquidos en tubos estériles.

“Stock” concentrado de ampicilina: Partimos de ampicilina en polvo (Nguyen-Distèche, 1974) con una concentración base de 200 mg/mL. Para ello preparamos en un tubo falcon estéril al que añadiremos 2g de ampicilina en polvo pesados anteriormente tras lo que añadiremos 10 mL de agua tipo II. Pasamos el tubo por un vortex hasta que se haya disuelto correctamente la ampicilina. Tras esto filtramos todo el contenido mediante una jeringa con un filtro de 0,2 nm de poro. El “stock” de antibiótico se guardará a -20°C para su correcta conservación hasta el siguiente uso.

### **3.4. Fluorescencia.**

Para realizar el estudio de la fluorescencia de las bacterias tras el tratamiento con lactonas y, posteriormente, con trans-cinamaldehído emplearemos un lector de placas Synergy HTX de la casa Biotek©. Los datos de las lecturas de las placas serán extraídos en archivos de Excel empleando el programa Gen5, el cual nos permite extraer a su vez gráficas de los datos producidos durante la lectura.

### **3.5. Autoinductor**

El autoinductor utilizado en este estudio es la AHL de la casa comercial Sigma-Aldrich® (Fuqua, 2001). Se ha preparado una serie de disoluciones de concentración  $10^{-4}$  de las que partimos para realizar los estudios planeados. Hemos disuelto 20  $\mu\text{L}$  del stock en 180  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura o tipo I. Repetimos las disoluciones en una serie de tubos eppendorf estériles que hemos etiquetado y guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta el siguiente uso.

### **3.6. Inhibidor.**

El inhibidor empleado en este estudio es el trans-cinamaldehído (Topa, 2020), un competidor antagónico de la AHL por el receptor de luxR.

Hemos disuelto 10  $\mu\text{L}$  del stock 99% en 100  $\mu\text{L}$  de etanol 100% en un tubo eppendorf estéril para preparar el stock de trabajo inicial 1/10 y se ha guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta su próximo uso. El resto de las diluciones empleadas se han hecho con etanol al 50%.

### **3.7. Preparación del biosensor para los ensayos de QS**

Empezamos realizando la primera siembra a partir de los gliceroles que tenemos guardados en la nevera a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tras poner el asa al rojo vivo extraemos una pequeña muestra del glicerol congelado y la extendemos sobre una sección de una placa preparada previamente. Continuamos las sucesivas siembras en la misma placa siguiendo la técnica de siembra por agotamiento para así asegurarnos de que las colonias que crezcan estén lo suficientemente individualizadas para poder distinguirlas. Terminada la siembra llevamos la placa a una incubadora donde las dejaremos a  $37^{\circ}\text{C}$  entre 12-24 horas. Como las cepas empleadas son overnight no requerirán de más tiempo para crecer.

Pasado el tiempo de incubación sacamos la placa de la incubadora e inspeccionamos las colonias que hayan crecido. Si están lo suficientemente bien diferenciadas e individualizadas podemos continuar con el procedimiento. De no estar podemos volver a realizar la siembra a partir del glicerol o dejarlas crecer un tiempo más.

Preparamos una serie de tubos estériles, 5-6, en los que vamos a preparar el medio LB con antibiótico para poder realizar la siembra en medio líquido. Emplearemos como siempre una concentración de ampicilina 200 mg/mL siguiendo una dilución 1/1000 por lo que añadiremos a los tubos 5 mL de medio líquido y 5  $\mu\text{L}$  de antibiótico.

Empezamos añadiendo los 5 mL de medio con la ayuda de una pipeta siempre manteniendo el fuego cerca para evitar contaminaciones. Posteriormente, añadimos los 5  $\mu\text{L}$  de antibiótico de un eppendorf de los que hemos preparado antes echando el líquido el tubo hacia al borde ya que si no tendríamos que introducir demasiado la pipeta pudiendo llegar a contaminar tanto la pipeta como la punta.

Teniendo preparado el medio con ampicilina en los tubos, procedemos con la extracción de colonias de la placa. Calentamos el asa hasta tenerla al rojo vivo y, tras

enfriarla, cogemos una colonia que esté bien diferenciada y la introducimos en el tubo siguiendo el mismo método que con el antibiótico. Acercamos el líquido hasta la boca del tubo y agitamos la punta del asa en la que están las bacterias para que se diluyan en el medio. Repetimos con todos los tubos y los dejamos en una gradilla dentro de la incubadora sobre un orbitador agitando los tubos a 195 rpm durante otras 12-24 horas.

Pasado el tiempo necesario, comprobaremos que en los tubos haya crecimiento. Reconoceremos el crecimiento si en el medio hay turbiedad. La turbiedad es un claro indicador del crecimiento bacteriano al poder verse de primera mano la densidad celular. Cuando veamos que la turbiedad es suficiente como para poder continuar, realizaremos los preparativos para hacer un estudio de la fluorescencia de las cepas que estamos utilizando.

### **3.8. Estudios de Fluorescencia**

Para realizar un estudio de fluorescencia necesitamos añadir a los cultivos AHL ya que las propias células no pueden sintetizarlos al carecer del gen LuxI que se lo permite. Al añadirlo nosotros de forma exógena permitiremos que se inicien las reacciones de QS activadas por una concentración suficientemente alta permea las paredes celulares y se une al LuxR que produce la célula, provocando un cambio conformacional que le permite unirse al promotor de GFP, sintetizándolo y dando lugar a una señal bioluminiscente que detectará la máquina.

Cogemos los tubos de la incubadora y realizamos una dilución 1/1000 de los cultivos siguiendo el mismo procedimiento que el día anterior. Esta dilución se emplea para volver a someter las cepas a un crecimiento hasta la fase exponencial y no estacionario como se encuentran tras estar tanto tiempo en la incubadora. Una vez preparados los tubos con la dilución 1/1000 del cultivo anterior lo dejamos en el orbitador otra vez durante 3 horas, tiempo suficiente para que vuelvan a entrar en crecimiento exponencial.

Pasadas las 3 horas cogemos los tubos para iniciar el procedimiento y realizar la lectura de fluorescencia. Necesitamos ponerlos en un baño de agua a 37°C hasta el momento en que añadamos a la placa las alícuotas de cultivo que necesitamos para evitar que los cultivos salgan de la fase exponencial de crecimiento. En el caso de que las células no se pudieran mantener en dicha fase en el momento que las pongamos en la máquina no crecerán durante la lectura que es lo que buscamos.

Prepararemos una placa multipocillo en la que vamos a tratar los cultivos con AHL. Tendremos listas diluciones seriadas de AHL desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  en una serie de pocillos. La placa deberá estar en hielo debido a que las AHL necesitan conservarse a baja temperatura para evitar su degradación. Todas las diluciones seriadas serán hechas con 20  $\mu$ L de lactonas en 180  $\mu$ L de agua ultrapura o tipo I empezando desde el stock y continuando con las siguientes diluciones.

Cuando tengamos listas las AHL, añadimos 10  $\mu$ L de cada concentración a los diferentes pocillos que le correspondan. En este estudio vamos a dividir la placa en filas, correspondiéndole a cada fila una concentración con el siguiente orden: Control-

Control-  $10^{-1}$ -  $10^{-2}$ -  $10^{-3}$ -  $10^{-4}$ -  $10^{-5}$ . Los controles empleados son de alícuotas de cultivo sin ningún tratamiento.

Añadidas las AHL, procedemos a mover la placa a un termobloque preparado previamente en el que mantendremos la placa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante el tiempo que añadimos las alícuotas de cultivo hasta el momento que vayamos a iniciar la lectura. Una vez puesta la placa en el termobloque añadimos en cada pocillo 200  $\mu\text{L}$  de cultivo de cada tubo hasta rellenar todos los que vayamos a utilizar.

Una vez añadidas las alícuotas de cultivo llevamos la placa a la máquina que realizará la lectura e iniciamos la lectura con los siguientes parámetros: incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , tiempo total de lectura 4 horas, lecturas cada 20 min, orbitación a alta velocidad durante 1 min previo a cada lectura, medición de absorbancia a 600 nm, excitación a 540 nm y lectura de emisión a 480 nm.

La lectura de absorbancia nos va a reportar en tiempo real el crecimiento de las bacterias, cuanto más absorbancia más densidad celular nos vamos a encontrar. Mientras que la lectura a 480 nm se corresponde a la medición de la fluorescencia de la GFP producida tras ser excitada por la luz a 540 nm.

Pasado el tiempo de lectura extraemos los datos de la máquina y vemos que los resultados se corresponden a lo esperado, habiendo una relación directa entre el crecimiento celular y el incremento de fluorescencia. Como no hemos podido establecer en esta lectura la concentración mínima de AHL que estimula el QS celular y por tanto el biosensor, realizamos otra medición en el lector cambiando las concentraciones de AHL que empleamos, pasando del rango de  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  a  $10^{-5}$ - $10^{-9}$ .

Una vez establecida la concentración mínima de AHL necesaria,  $10^{-8}$ , para producir un estímulo del QS de nuestra cepa pasamos a la segunda parte del estudio. Ahora repetiremos el procedimiento empleando una única concentración de AHL además de añadir un inhibidor para medir su capacidad de reducir el QS. El inhibidor que vamos a emplear es el cinamaldehído o CA, un compuesto con capacidad antagónica de las AHL que compite por el lugar de unión en luxR.

Para comprobar sus efectos repetiremos el procedimiento anterior con algunos cambios como hemos dicho anteriormente. Mantendremos la concentración mínima de AHL, en este caso  $10^{-8}$  y emplearemos una serie de concentraciones de inhibidor desde 1/100 hasta 1/3200.

Habiendo preparado una placa multipocillo vamos a realizar las diluciones de inhibidor y la dilución  $10^{-8}$  de AHL que mantendremos refrigeradas en hielo como en la parte anterior. Empezamos a partir de una preparación de CA stock diluida al 10% en etanol o EtOH al 100%. La primera dilución que haremos será la 1/100 realizando la dilución en EtOH al 50% por lo que añadiremos 180  $\mu\text{L}$  de EtOH al 50% y 20  $\mu\text{L}$  de CA para así obtener 200  $\mu\text{L}$  de CA 1/100. Con 100  $\mu\text{L}$  de esa dilución los redisolvemos en 100  $\mu\text{L}$  de EtOH al 50% y repetimos hasta obtener la última dilución 1/3200 de CA. Una vez preparadas las diluciones podremos empezar a mezclar los componentes en los pocillos de la placa.

Como hemos hecho anteriormente mantendremos los tubos de cultivo que hemos preparado 3 horas antes en un baño de agua a 37°C y podremos poner la placa en el termobloque para mantener una temperatura estable durante todo el proceso.

Vamos a volver a dividir la placa en filas, con cada fila asociada a un control o concentración de CA. En este caso se organizarán de la siguiente forma: Control cultivo+ AHL- Control cultivo+ EtOH- CA 1/100- CA 1/200- CA 1/400- CA 1/800- CA 1/1600- CA 1/3200.

En el primer control vamos a añadir a una alícuota de 200 µL de cultivo 10 µL de AHL para tener una medición con la que comparar la reacción entre con y sin inhibidor. En el segundo control vamos a añadir a los 200 µL de cultivo 10 µL de EtOH al 50% para medir la absorbancia de fondo y posteriormente tenerla en cuenta en los cálculos. En los demás pocillos de cada fila vamos a añadir en este orden 10 µL de CA de cada concentración correspondiente, 200 µL de cultivo de cada tubo y 10 µL de AHL a  $10^{-8}$ . Se deben añadir en ese orden para que el inhibidor y las AHL no tengan ningún tipo de interacción extraña.

Una vez mezclados todos los componentes procedemos a llevar la placa al lector. Como en la parte anterior midiendo la fluorescencia solo con AHL debemos mantener la temperatura estable en todo momento. Ya en el lector los parámetros de lectura serán los mismos.

### **Tratamiento de datos**

Para realizar las gráficas hemos obtenido FI/OD(600) dividiendo los datos de fluorescencia FI por la absorbancia OD<sub>600</sub>. Hemos normalizado FI/OD(600) para una mejor visualización de los datos en base a la diferencia de las mediciones del controles. Hemos calculado las diferencias respecto al valor más elevado. Los valores obtenidos los hemos sumado a cada uno de los datos correspondientes a su mismo tiempo de medición que hemos obtenido tras calcular FI/OD(600) y lo hemos representado mediante un gráfico de líneas con marcadores.

## **4. Resultados**

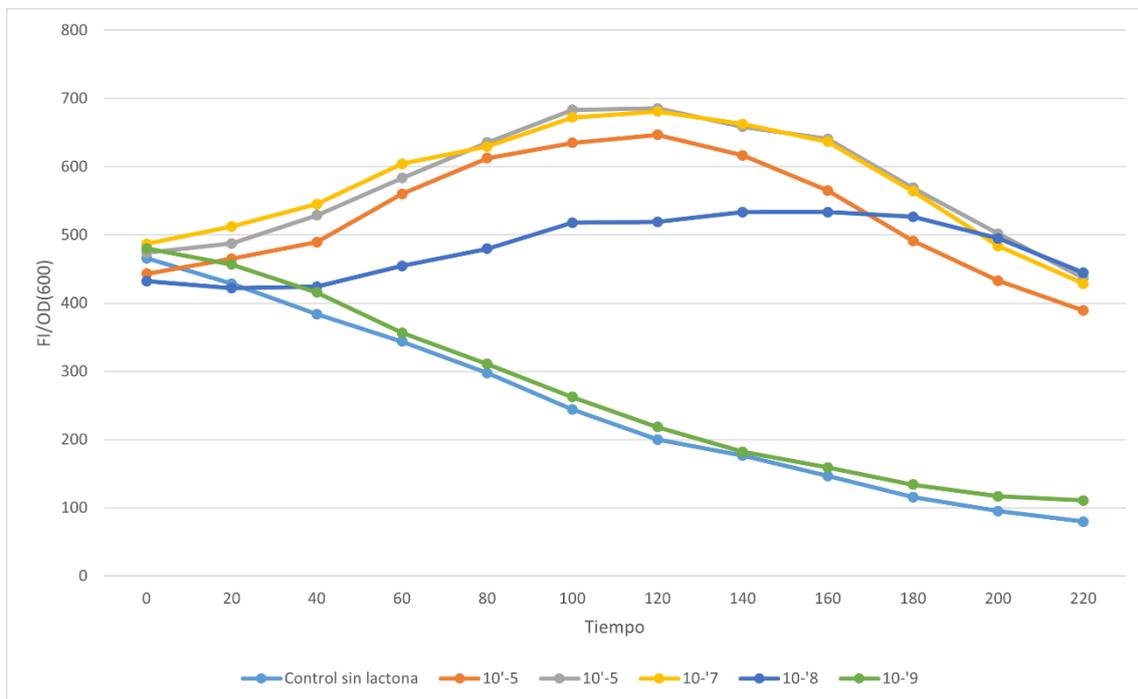
### **4.1. Estudio de fluorescencia**

Durante la primera parte del estudio en la que medimos la interacción de las AHL con el biosensor que estamos estudiando hemos realizado dos medidas distintas a diferentes rangos de dilución respecto al stock.

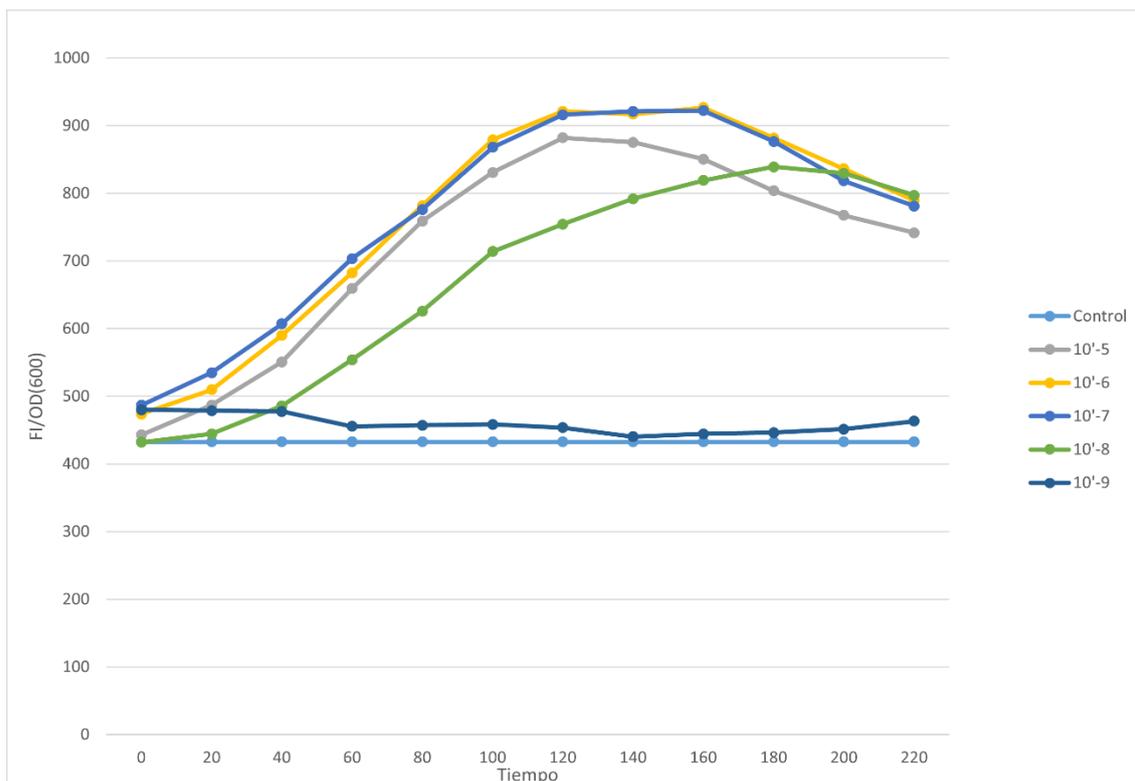
En la primera medición en el rango de dilución entre  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  hemos observado una clara relación entre la concentración creciente de AHL y una fluorescencia creciente que se corresponde con nuestras hipótesis en las que el biosensor necesitaba un aporte externo de AHL que se unieran a LuxR y éste al promotor de GFP dando lugar a una respuesta bioluminiscente que fue medida en el estudio de fluorescencia. Los datos extraídos del programa Gen5 muestran un

incremento continuo durante el tiempo que ha durado la lectura, entre 180-220 min generalmente, de los valores de absorbancia a 600 nm y de fluorescencia con estimulación a 540 nm y emisión a 480 nm. Sin embargo, los valores obtenidos son demasiado altos y no hemos podido localizar la concentración mínima que necesitamos para conducir el procedimiento en la segunda parte.

Repetimos el procedimiento con concentraciones menores entre  $10^{-5}$  y  $10^{-9}$  como habíamos explicado anteriormente. En esta lectura se observa claramente que una concentración de  $10^{-8}$  es el mínimo necesario para estimular el QS del biosensor que estamos empleando para el estudio. Estos datos concuerdan con las teorías de Vila en 2021 en las que cuanto más AHL añadamos, más rápido crecen las curvas de FI/OD(600).



**Gráfica 1.** Datos sin procesar de la relación entre fluorescencia y absorbancia (FI/OD) frente al tiempo de crecimiento en una réplica de las 6 realizadas de un tratamiento a diferentes diluciones de AHL a fin de determinar la concentración mínima necesaria para estimular el QS. La disminución de los valores observados puede deberse a la utilización de un medio distinto respecto a Vila en 2021. Estamos usando un medio LB y en su caso es un medio mínimo M9.



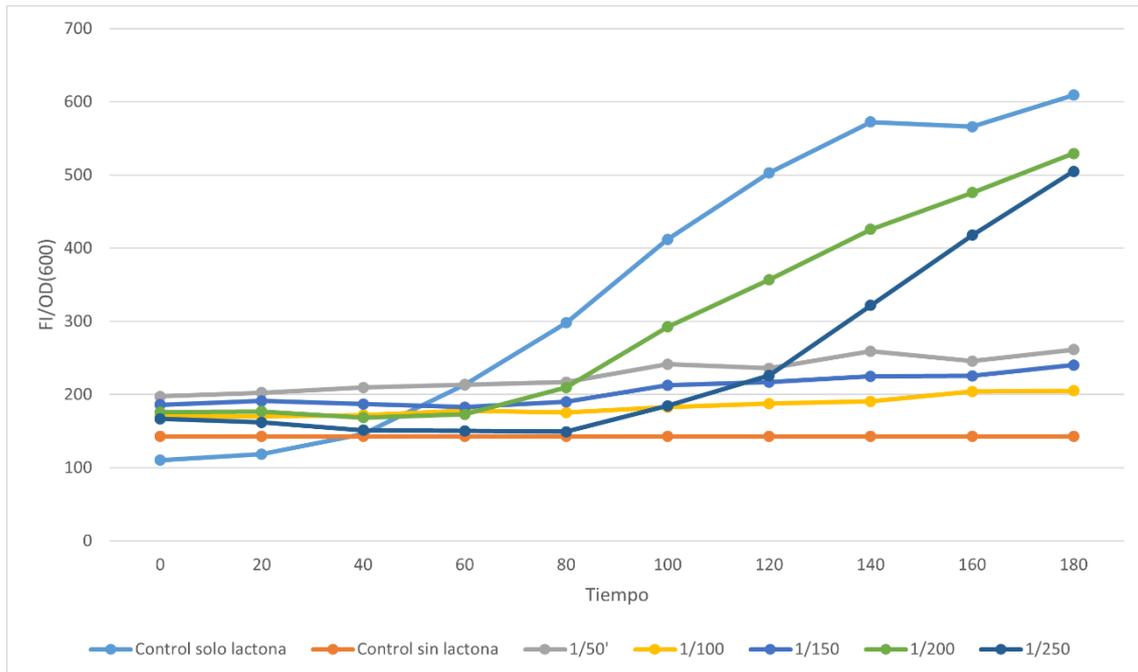
**Gráfica 2.** Datos procesados de la relación entre fluorescencia y absorbancia (FI/OD) frente al tiempo de crecimiento en una réplica de las 6 realizadas de un tratamiento a diferentes diluciones de AHL a fin de determinar la concentración mínima necesaria para estimular el QS. Los datos se han normalizado para una mejor visualización en base a las diferencias respecto al valor más alto de la media de los controles. Dichos valores se han sumado a los correspondientes a su mismo tiempo de medición.

En la segunda parte del estudio realizamos el mismo procedimiento añadiendo además de las AHL a la concentración de trabajo correspondiente a una dilución  $10^{-8}$  del stock original. Utilizamos diluciones decrecientes de CA, partiendo de diluciones 1/100 a 1/3200 del stock original para estudiar su efecto inhibitorio. En el primer experimento conducido se observa claramente que a partir de una concentración de 1/400 el inhibidor no es capaz de mantener sus efectos inhibitorios mientras que en concentraciones superiores reduce significativamente la fluorescencia medida por el lector.

Terminada la lectura, al extraer los datos observamos que algunas concentraciones de inhibidor eran demasiado bajas por lo que repetimos el procedimiento en un rango de concentraciones más altas pasando del rango de diluciones 1/100- 1/3200 a 1/50- 1/250.

Repetimos el procedimiento con un rango diferente de concentraciones de CA (diluciones 1/50 a 1/250), para observar mejor el efecto del CA sobre el sistema de QS del biosensor. Tras la lectura los datos muestran que la concentración mínima a la que el inhibidor reduce significativamente el QS de este biosensor tras ser tratado con una concentración de AHL de  $10^{-8}$  se encuentra entre 1/200 y 1/250. Sin embargo, se puede ver que la curva de 1/200 y 1/250 están intercambiadas. Según las teorías de Vila, 2021; cuanto menos concentración de inhibidor añadamos la curva de FI/OD(600) debería crecer más rápido por lo que el hecho de que las curvas estén intercambiadas

es posible que se deba a algún tipo de fallo durante el procedimiento, por lo que sería necesaria a futuro una nueva comprobación.



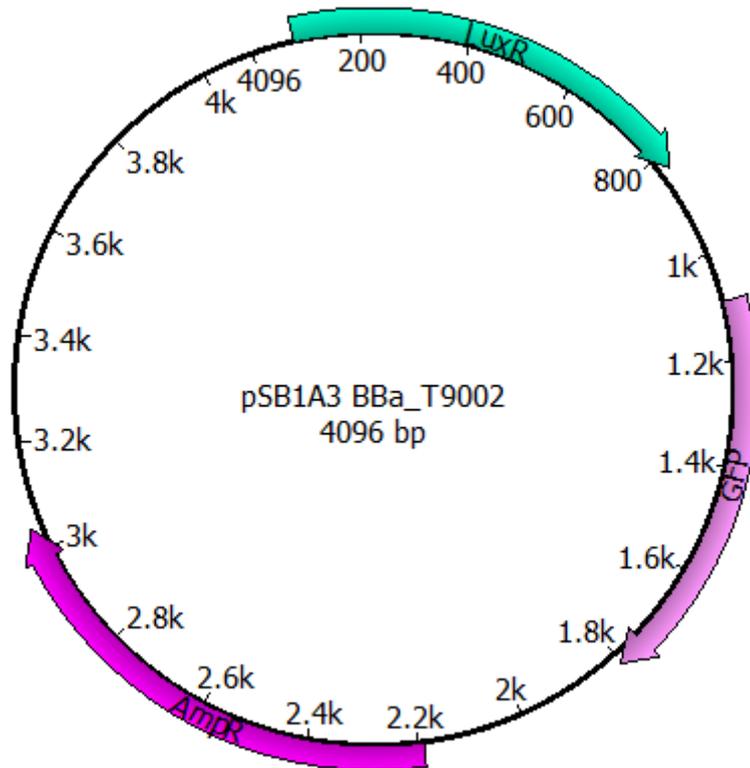
**Gráficas 2.** Datos procesados de la relación entre fluorescencia y absorbancia (FI/OD) frente al tiempo de crecimiento en una de las réplicas de las 5 realizadas un tratamiento a diferentes concentraciones de CA. Se observa que la concentración mínima a la que el CA pierde la capacidad inhibitoria se encuentra entre 1/150 y 1/200. Los valores se han normalizado para una mejor visualización en base a las diferencias del valor más alto del control negativo sin AHL. Dichos valores se han sumado a los correspondientes a su mismo tiempo de medición.

#### 4.2. Recreación del plásmido

Por último, hemos recreado un mapa aproximado de este plásmido mediante el programa UGENE a partir de las partes individuales pSB1A3 (<https://parts.igem.org/Part:pSB1A3>) y BBa\_T9002 ([https://parts.igem.org/Part:BBa\\_T9002](https://parts.igem.org/Part:BBa_T9002)). debido a la ausencia de información sobre su creación en las bases de datos.

En el segmento vector pSB1A3 se encuentra el gen de resistencia a la ampicilina, la cual añadimos para mantener una presión selectiva que impida que la bacteria pierda el plásmido a lo largo de las generaciones como hemos indicado anteriormente.

En el segmento biosensor BBa\_T9002 se encuentra un gen *luxR* constitutivo, que sobreexpresará la síntesis de LuxR produciéndola continuamente.



**Figura 5.** Mapa del plásmido obtenido mediante UGENE. Se ha recreado empleando las partes pSB1A3 (<https://parts.igem.org/Part:pSB1A3>) y Bba\_T9002 ([https://parts.igem.org/Part:Bba\\_T9002](https://parts.igem.org/Part:Bba_T9002)). En la parte pSB1A3 se encuentra AmpR, un gen de resistencia a la ampicilina. En la parte Bba\_T9002 se encuentran *luxR* y GFP.

### 4.3. Clonaje en un vector de bajo número de copias

Tras la recreación del plásmido en el programa y obtenida la secuencia aproximada, procedemos a diseñar unos cebadores con los que realizar una PCR *in silico* mediante la cual vamos a añadir un lugar de restricción BamHI.

>Reverse

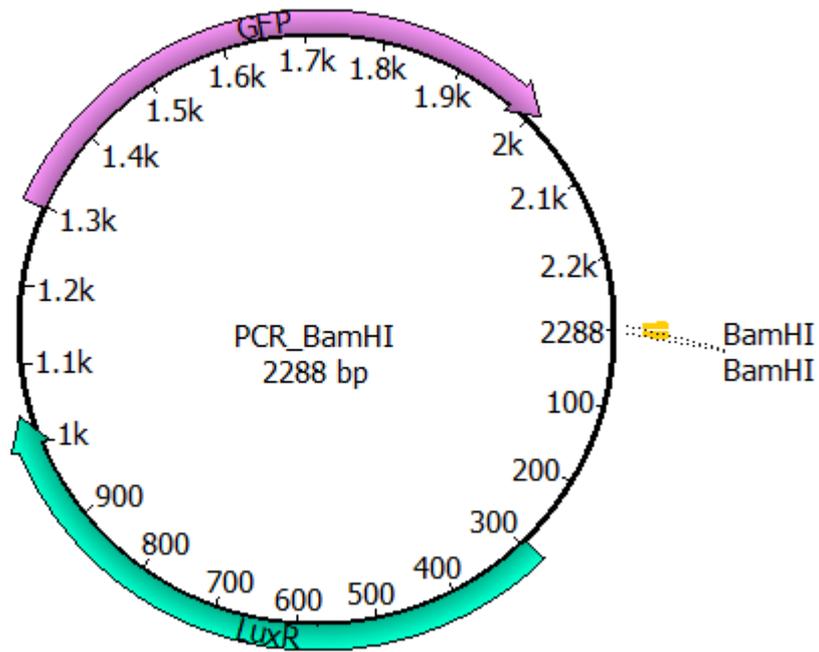
5'-CGGGATCCGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC-3'

>Forward

5'-CCGGATCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACC-3'

5'... GGATCC ... 3'  
3'... CCTAGG ... 5'

**Figura 6.** Cebadores obtenidos mediante el programa UGENE. En rojo está marcada la secuencia de restricción de la enzima BamHI.



**Figura 7.** Mapa plasmídico resultado de la PCR. Se conservan los genes de *luxR* y de GFP, mientras que se ha perdido el gen de resistencia a la ampicilina. Se pueden observar los sitios de restricción de BamHI que han sido añadidos por los cebadores de la figura 6.

**Status** Finished  
**Time** 0h 00m 00.067s

Products found: 1

Primers details:

Criteria	Valid Values	Forward	Reverse
% GC	50-60	55.26	55.26
T <sub>m</sub> (°C)	55-80	69.86	69.86
GC Clamp	>=1 G or <u>C</u> at 3' end	3	2
Runs	<=4 base runs	3	4

**Self-dimers:**

**Delta G: -16 kcal/mole Base Pairs: 9**

```
          CGGGATCCGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC
          : ||||| :
CGAGTGAGTTCCGCCATTATGCCAATAGGCCTAGGGC
```

**Delta G: -10.9 kcal/mole Base Pairs: 7**

```
          CCGGATCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACC
          : ||||| :
CCAAAGAATCTGCAGTCCACCGTGAAAAGCCCTAGGGC
```

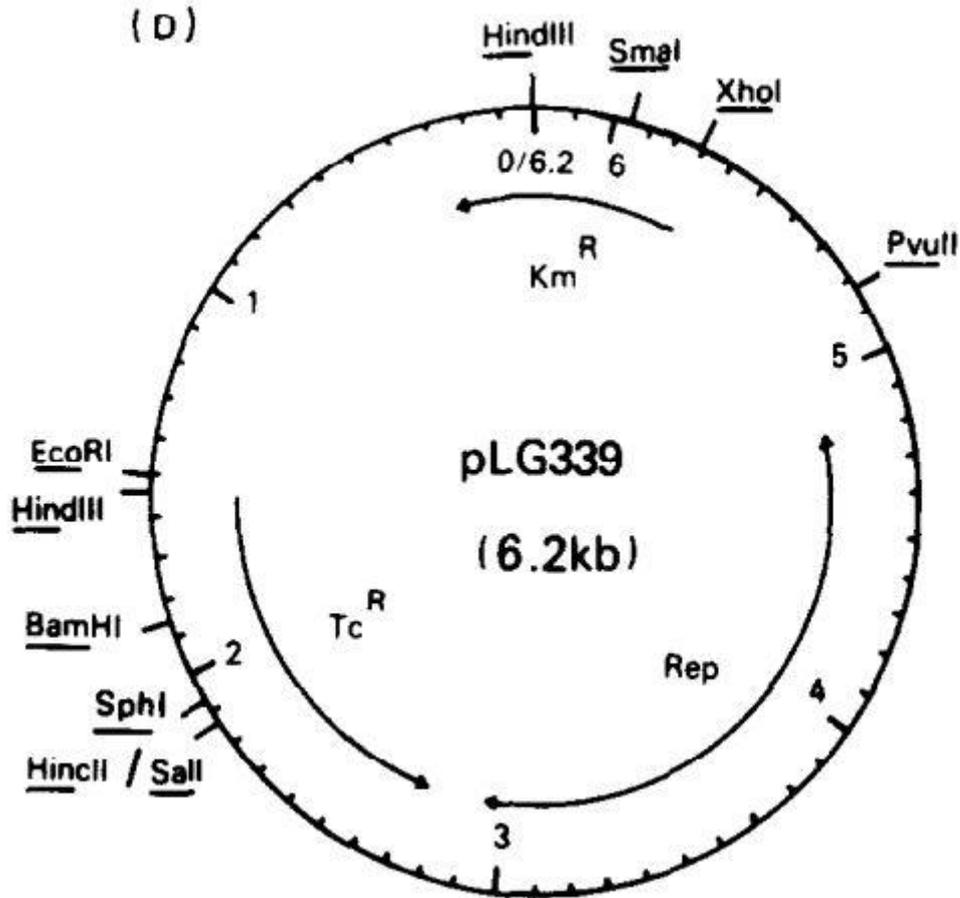
**Hetero-dimers:**

**Delta G: -24.3 kcal/mole Base Pairs: 10**

```
          CGGGATCCGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC
          |||||
CCAAAGAATCTGCAGTCCACCGTGAAAAGCCCTAGGGC
```

**Figura 8.** Informe extraído de UGENE tras la realización de la PCR *in silico* de pSB1A3-BBa\_T9002 con los cebadores de la figura 6.

Una vez añadido el lugar de restricción deseado queda pendiente a futuro realizar un clonaje del plásmido obtenido que incluye el gen de luxR y de GFP en otro plásmido pLG339, un plásmido vector de bajo número de copias que nos va a servir para reducir el nivel de expresión de luxR (Stoker, 1982).



**Figura 9.** Mapa plasmídico de pLG339. Es un vector de bajo número de copias que emplearemos para realizar el clonaje con el resultado de la PCR mostrada en la figura 7. Se puede observar que ambos comparten sitios de restricción para BamHI y que posee genes de resistencia a la kanamicina y la tetraciclina. (Stoker, 1982).

## 5. Conclusión.

El descubrimiento del QS durante los años 70 inició un gran campo de investigación que continúa hasta nuestros días con cada vez más descubrimientos. Los resultados de este estudio nos muestran que podemos crear biosensores que funcionan para la detección de AI específicos que podemos usar para la detección de especies capaces de emplear el lenguaje tan complejo que supone en comunidades *in vivo*. Al mismo tiempo podemos emplear esta investigación para abrir camino en el descubrimiento de nuevas vías para la eliminación de bacterias patógenas gracias a la presencia de inhibidores para la búsqueda de métodos con los que cortar esa comunicación, hito importante debido a la resistencia adquirida a los antibióticos por muchas de ellas.

## 6. Bibliografía.

ATLAS, R.M., 2010. *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition*. Taylor & Francis ISBN 9781439804063. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=Pj5FA-QAAIAAJ>.

AZIMI, S., KLEMENTIEV, A.D., WHITELEY, M. y DIGGLE, S.P., 2020. Bacterial Quorum Sensing During Infection. *Annual Review of Microbiology*, vol. 74, no. 1, pp. 201-219. ISSN 0066-4227. DOI 10.1146/annurev-micro-032020-093845. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032020-093845>.

CHALFIE, M., et al, 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, Feb 11, vol. 263, no. 5148, pp. 802-805. ISSN 0036-8075; 0036-8075. DOI 10.1126/science.8303295.

CHOI, S.H. and GREENBERG, E.P., 1991. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, Dec 15, vol. 88, no. 24, pp. 11115-11119. MEDLINE. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.88.24.11115. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/88/24/11115.abstract>.

DE KIEVIT, T.R. and IGLEWSKI, B.H., 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and immunity*, Sep 1, vol. 68, no. 9, pp. 4839-4849. MEDLINE. ISSN 0019-9567. DOI 10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10948095>.

EBERHARD, A., 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *Journal of Bacteriology*, Mar, vol. 109, no. 3, pp. 1101-1105. ISSN 0021-9193; 1098-5530; 0021-9193. DOI 10.1128/jb.109.3.1101-1105.1972.

FUQUA, C., PARSEK, M.R. y GREENBERG, E.P., 2001. REGULATION OF GENE EXPRESSION BY CELL-TO-CELL COMMUNICATION: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annual review of genetics*, Jan 1, vol. 35, no. 1, pp. 439-468. MEDLINE. ISSN 0066-4197. DOI 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>.

FUQUA, C., WINANS, S.C. y GREENBERG, E.P., 1996. CENSUS AND CONSENSUS IN BACTERIAL ECOSYSTEMS: The LuxR-LuxI Family of Quorum-Sensing Transcriptional Regulators. *Annual review of microbiology*, Jan 1, vol. 50, no. 1, pp. 727-751. MEDLINE. ISSN 0066-4227. DOI 10.1146/annurev.micro.50.1.727. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.727>.

HADLA, M. and HALABI, M.A., 2018. Chapter Three - Effect of Quorum Sensing. *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 95-116. ISSN 0166-526X. DOI 10.1016/bs.coac.2018.02.004. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166526X18300059>.

HANZELKA, B.L. and GREENBERG, E.P., 1995. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *Journal of Bacteriology*, Feb, vol. 177, no. 3, pp. 815-817. ISSN 0021-9193; 1098-5530; 0021-9193. DOI 10.1128/jb.177.3.815-817.1995.

HANZELKA, B.L., et al, 1999. Acylhomoserine Lactone Synthase Activity of the *Vibrio fischeri* AinS Protein. *Journal of Bacteriology*, Sep 1, vol. 181, no. 18, pp. 5766-5770. MEDLINE. ISSN 0021-9193. DOI 10.1128/JB.181.18.5766-5770.1999. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/181/18/5766.abstract>.

JAYARAMAN, A. and WOOD, T.K., 2008. Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annual review of biomedical engineering*, Jan 1, vol. 10, no. 1, pp. 145-167. MEDLINE. ISSN 1523-9829. DOI 10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536>.

NAM, E., et al, 1998. Biosensor development. *Current opinion in chemical biology*, vol. 2, no. 5, pp. 585-591. NDL-OPAC. ISSN 1367-5931. DOI 10.1016/S1367-5931(98)80087-2. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593198800872>.

NG, W. and BASSLER, B.L., 2009. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics*, Jan 1, vol. 43, no. 1, pp. 197-222. MEDLINE. ISSN 0066-4197. DOI 10.1146/annurev-genet-102108-134304. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>.

NGUYEN-DISTÈCHE, M., et al, 1974. Sensitivity to ampicillin and cephalothin of enzymes involved in wall peptide crosslinking in *Escherichia coli* K12, strain 44. *European journal of biochemistry*, Feb 1, vol. 41, no. 3, pp. 457-463. ISSN 0014-2956; 0014-2956. DOI 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03287.x.

QIN, X., et al, 2020. Screening of Bacterial Quorum Sensing Inhibitors in a *Vibrio fischeri* LuxR-Based Synthetic Fluorescent *E. coli* Biosensor. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, Sep 22, vol. 13, no. 9, pp. 263. CrossRef. ISSN 1424-8247. DOI 10.3390/ph13090263. Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/2446663391>.

SCHAEFER, A.L., et al, 1996. Generation of Cell-To-Cell Signals in Quorum Sensing: Acyl Homoserine Lactone Synthase Activity of a Purified *Vibrio fischeri* LUXI Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, Sep 3, vol. 93, no. 18, pp. 9505-9509. MEDLINE. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.93.18.9505. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/39740>.

STOKER, N.G., FAIRWEATHER, N.F. y SPRATT, B.G., 1982. Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene*, Jun, vol. 18, no. 3, pp. 335-341. ISSN 0378-1119; 0378-1119. DOI 10.1016/0378-1119(82)90172-x.

TSIEN, R.Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 67, pp. 509-544. ISSN 0066-4154; 0066-4154. DOI 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.

TSIEN, R.Y., 1998. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 67, no. 1, pp. 509-544. ISSN 0066-4154. DOI 10.1146/annurev.biochem.67.1.509. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.

VILA SANJURJO, C., 2021. *Comunicación bacteriana: fundamentos y estrategias de interferencia*. Universidade de Santiago de Compostela Disponible en: <http://hdl.handle.net/10347/26616>.

VILA-SANJURJO, C., et al., 2016. *A single intracellular protein governs the critical transition from an individual to a coordinated population response during quorum sensing: Origins of primordial language*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sep 09, Publicly Available Content Database. DOI 10.1101/074369. Disponible en: <https://search.proquest.com/docview/2070488958>.

VISVALINGAM, J., HERNANDEZ-DORIA, J.D. y HOLLEY, R.A., 2013. Examination of the genome-wide transcriptional response of Escherichia coli O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 20121126, Feb, vol. 79, no. 3, pp. 942-950. ISSN 1098-5336; 0099-2240; 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.02767-12.

YOSSA, N., PATEL, J., MILLNER, P. y LO, Y.M., 2012. Essential oils reduce Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on spinach leaves. *Journal of food protection*, Mar, vol. 75, no. 3, pp. 488-496. ISSN 1944-9097; 0362-028X. DOI 10.4315/0362-028X.JFP-11-344.

ZIMMER, M., 2002. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical reviews*, Mar 1, vol. 102, no. 3, pp. 759-782. MEDLINE. ISSN 0009-2665. DOI 10.1021/cr010142r. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/cr010142r>.