



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Selección de la población con sistemas de quórum activos por acción de la pirocianina como estrategia para restringir el oportunismo social en *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
QFB. PAULINA CASTAÑEDA TAMEZ

TUTOR PRINCIPAL
Dr. RODOLFO GARCIA CONTRERAS
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. PAOLA LICONA LIMÓN
Instituto de Fisiología, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., Abril 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: González Pedrajo Bertha María Josefina

VOCAL: Puente García José Luis

VOCAL: Georgellis Dimitris

VOCAL: Servín González Luis

SECRETARIO: Camarena Mejía Rosa Laura

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente proyecto se realizó en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Departamento de Funciones Biológicas e Ingeniería de la Escuela de Posgrado de Ciencias de la Vida e Ingeniería de Sistemas en el Instituto de Tecnología de Kyushu en Japón.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado con el apoyo por parte de CONACyT, el “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) y por la Organización de Servicios Estudiantiles de Japón (JASSO).

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	3
2. RESUMEN	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
3.2. <i>Quorum sensing</i>	7
3.2.1. Sistema de <i>quorum sensing</i> Las.....	9
3.2.2. Sistema de <i>quorum sensing</i> Rhl.....	10
3.2.3. Sistema de <i>quorum sensing</i> Pqs	11
3.3. Bienes públicos	12
3.4. <i>Cheaters</i> o Tramposos.....	13
3.5. Selección de poblaciones.....	15
3.5.1. Estreses externos	15
3.5.2. Estreses internos	16
3.6. Fenazinas y Pilocianina	18
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS.....	22
6. OBJETIVO	22
6.1. Objetivos específicos:	22
7. METODOLOGÍA	23
7.1. Cepas utilizadas.....	23
7.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
7.1.2. <i>Escherichia coli</i>	23
7.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	23
7.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
7.2. Medios de cultivo	24
7.2.1. Medio y placas Luria-Bertani (LB).....	24
7.2.2. Medio de Caseína 0.5% - M9	24
7.2.3. Medio de casaminoácidos 0.5%-M9.....	25
7.2.4. Placas de leche	25
7.3. Condiciones de cultivo	25
7.3.1. Concentración de proteasa.....	26
7.3.2. Concentración de pilocianina	26
7.3.3. Concentración de oxígeno.....	27
7.4. Parámetros determinados	28

7.4.1.	Crecimiento celular y proporciones.....	28
7.4.2.	Factores de virulencia.....	29
7.4.3.	Extracción de DNA	31
7.4.4.	PCR	32
7.5.	Método de modificación de la cepa PA14K.....	33
7.5.1.	Transducción	33
7.6.	Análisis estadístico.....	34
7.7.	Esquemas de las metodologías	35
8.	RESULTADOS.....	43
8.1.	Oportunismo de las células sin <i>quorum sensing</i> activo ($\Delta lasR \Delta rhIR$) en competencia con WT	43
8.2.	Efecto de la piocianina sobre las células sin <i>quorum sensing</i> ($\Delta lasR \Delta rhIR$) 52	
8.2.1.	Ausencia de piocianina.....	52
8.2.2.	Adición de piocianina.....	58
8.3.	Mecanismo de acción de la piocianina sobre células sin sistemas de quórum activos ($\Delta lasR \Delta rhIR$).....	61
8.4.	Efecto de la piocianina en la aparición de mutantes sin proteasa	65
8.5.	Competencia entre <i>P. aeruginosa</i> con otras especies (<i>E. coli</i> DH5 α y <i>S. aureus</i>).....	67
8.6.	Efecto de la piocianina sobre <i>A. baumannii</i> con sistema de quórum activo e inactivo.....	76
9.	DISCUSIÓN	80
10.	CONCLUSIONES.....	88
11.	PERSPECTIVAS	89
12.	ANEXO.....	90
12.1.	Estreses externos que modifican la población en competencias entre individuos con <i>quorum sensing</i> activo y sin <i>quorum sensing</i>	90
12.2.	Índice de figuras.....	91
12.3.	Índice de tablas.....	96
13.	BIBLIOGRAFIA.....	97

2. RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa cuenta con diversos sistemas de percepción de quórum que son los responsables de coordinar la expresión de una gran cantidad de factores de virulencia y fomentar algunas conductas como la generación de biopelícula o el movimiento. Dentro de los compuestos que son regulados por la activación de los sistemas de quórum, existe una clasificación entre bienes privados y públicos. Los bienes privados son aquellos cuya función solo favorece a los productores de estos factores, mientras que los bienes públicos benefician a la población en general. Los bienes públicos pueden ser usados por mutantes e incluso por otras especies sin la necesidad de contribuir a la producción de estos bienes, estos individuos son llamados oportunistas sociales o *cheaters*. La presencia de estos oportunistas pone en peligro el equilibrio de la población, debido a que estos tienen una ventaja sobre los productores de los bienes al evadir el costo de la producción y concentrar su energía en el crecimiento. De este modo, la población productora puede ser superada por los no productores y provocar el desplome de la población, al ser incapaz de aprovechar el sustrato de crecimiento entre otras cosas. Para evitar esta situación existen varios compuestos que pueden ser utilizados para limitar el aumento de la población oportunista, basados en las deficiencias de esta población. La piocianina es una fenazina producida por *P. aeruginosa*, dependiente de la percepción del quórum con actividad redox y se caracteriza por promover la generación de especies reactivas de oxígeno. También es conocida por sus propiedades antibacterianas en contra de diferentes especies. Una de las ventajas de la población con sistemas de quórum activos, es la reacción frente al estrés oxidativo que les permite responder de mejor manera que la población sin estos sistemas activos. Con base en esto la hipótesis de este proyecto fue que la piocianina producida por los individuos con sistemas de quórum activos, era capaz de ejercer una selección de estos individuos por sobre los individuos oportunistas en competencias entre ambas poblaciones. Además, se demostró que la presencia de este factor de virulencia tiene un efecto negativo en el aumento de la población oportunista (mutantes sin quórum y diferentes especies) en varias condiciones y que su posible mecanismo de acción está basado en la generación de especies reactivas de oxígeno a las cuales la población oportunista es más sensible. También se demostró que la piocianina limita la aparición de mutantes sin proteasas en cultivos iniciados solo con poblaciones cooperadoras (células con los sistemas de quórum funcionales), y que es capaz de seleccionar individuos cooperadores de otras especies como *Acinetobacter baumannii*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* y al género *Pseudomonas*. Tiene forma de bacilo con 1.5 a 2 μm de largo y 0.5 a 1 μm de ancho. Cuenta con movilidad debido a la presencia de flagelos, es capaz de sobrevivir y crecer en una gran variedad de ambientes. Se considera aerobio estricto pero tiene la capacidad de crecer en anaerobiosis sustituyendo el oxígeno por nitrato o arginina como últimos aceptores de electrones (Hassett et al., 1996; Delden et al., 1998; Schreiber et al., 2007; Sudhakar et al., 2015). Tiene una amplia capacidad de crecimiento, es decir que no necesita ningún requerimiento nutricional específico, además de los esenciales; en condiciones de laboratorio su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C a 42°C. Las pruebas bioquímicas que se utilizan para su identificación son oxidasa y catalasa positiva, son hemolíticas, en la prueba de indol resultan negativas, no fermenta carbohidratos, pero puede oxidar glucosa en algunas ocasiones, también se caracteriza por la producción de pigmentos verde-azulados (GeoF et al., 2007).

P. aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de infecciones nosocomiales graves, afectando principalmente a personas inmunocomprometidas, con quemaduras y a pacientes con fibrosis quística. Las infecciones con esta bacteria representan un serio caso de salud pública ya que esta bacteria presenta una resistencia natural a una gran cantidad de antibióticos, por lo que es muy difícil su tratamiento (Van Delden et al., 1998; Whiteley et al., 1999; Schuster et al., 2006). También es capaz de infectar a plantas e invertebrados (Mahajan-Miklos et al., 1999).

Esta bacteria cuenta con una gran cantidad de compuestos intracelulares y extracelulares que en muchos casos, son considerados los factores que la proveen de virulencia (Van Delden et al., 1998). La expresión y producción coordinada de estos factores de virulencia se debe a un complejo circuito regulatorio que involucra sistemas de señalización de célula a célula, que dependen de la densidad celular (Van Delden et al., 1998; Schuster et al., 2006). Además de controlar la expresión de muchos factores de virulencia, los sistemas de señalización también controlan genes relacionados con funciones metabólicas y biosíntesis de cofactores, esto mediante la modificación postraduccional, el plegamiento de proteínas y la proteólisis, teniendo así un efecto muy importante para la adaptación de las bacterias a su entorno (Schuster et al., 2006).

3.2. Quorum sensing

Las bacterias son capaces de sentir su entorno y procesar la información para reaccionar adecuadamente a los estímulos (Van Delden et al., 1998). Por lo tanto, no fue inesperado cuando se descubrió que también son capaces de percibir el tamaño de su población y ajustar la expresión de los genes coordinadamente para reaccionar de manera conjunta a los estímulos ambientales, todo esto mediante la secreción de moléculas difusibles de señalización. A este fenómeno se le conoce como percepción de quórum o *quorum sensing* (QS). Estos sistemas se conforman en su mayoría por tres componentes: la sintasa de la molécula señal, la molécula señal y el receptor efector. La respuesta de la población es percibida en el exterior como la expresión conjunta de factores de virulencia, metabolitos secundarios, la formación de biopelícula y la motilidad, entre otras características (Chan et al., 2015; Smalley et al., 2015).

Los sistemas de percepción de quórum para las bacterias Gram positivas involucra péptidos como las señales que activan a los receptores membranales, que generalmente son sistemas de dos componentes (cinasa sensor y regulador respuesta) (Chan et al., 2015). Mientras que en las bacterias Gram negativas sus sistemas de percepción de quórum se componen de moléculas pequeñas llamadas autoinductores (en su mayoría homoserín-lactonas con diferentes longitudes y sustituciones en las cadenas aciladas), estas se sintetizan mediante una sintasa y que se unen a una proteína receptora para convertirse en un factor de transcripción activo y regular la expresión de los genes que controla, entre ellos los que codifican a sus sintasas (Figura 1) (Van Delden et al., 1998; Whiteley et al., 1999).

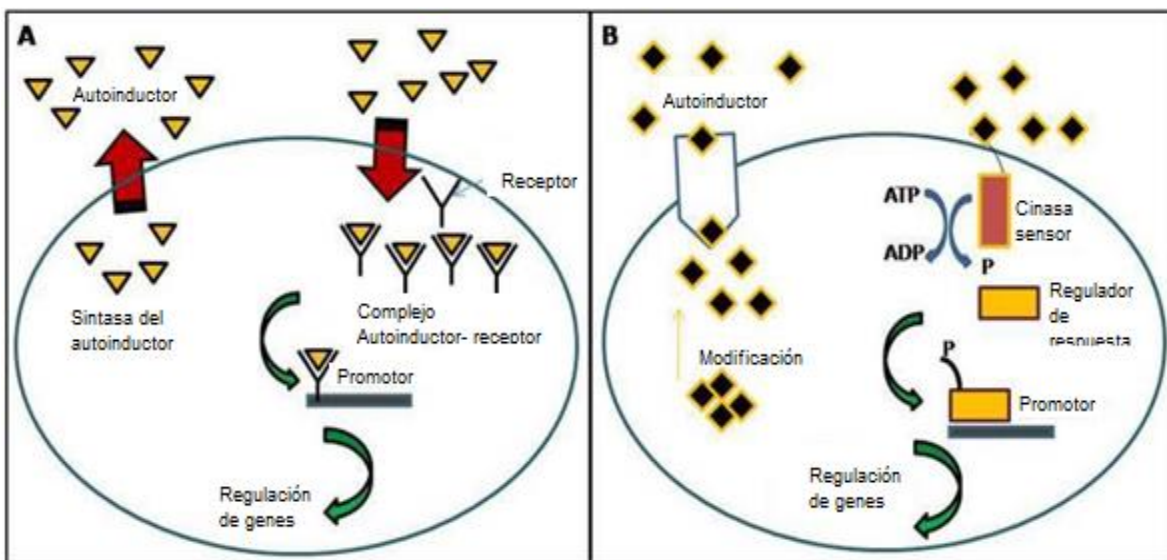


Figura 1 Esquema de los sistemas de quorum sensing en bacterias Gram A) negativas y B) positivas (Koh et al., 2013).

El primer sistema de señalización célula a célula que se describió, fue el sistema Lux, responsable del control de los genes de la bioluminiscencia en la bacteria marina *Vibrio fischeri*. En este caso el sistema Lux está compuesto por la sintasa LuxI, el autoinductor N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C6HSL) y la molécula receptora LuxR (proteína R) (Van Delden et al., 1998). Los genes de bioluminiscencia están codificados en el operón *luxICDABE* y la unión del autoinductor y el regulador transcripcional activa su expresión y con esto la producción de luz (Figura 2) (Chan et al., 2015).

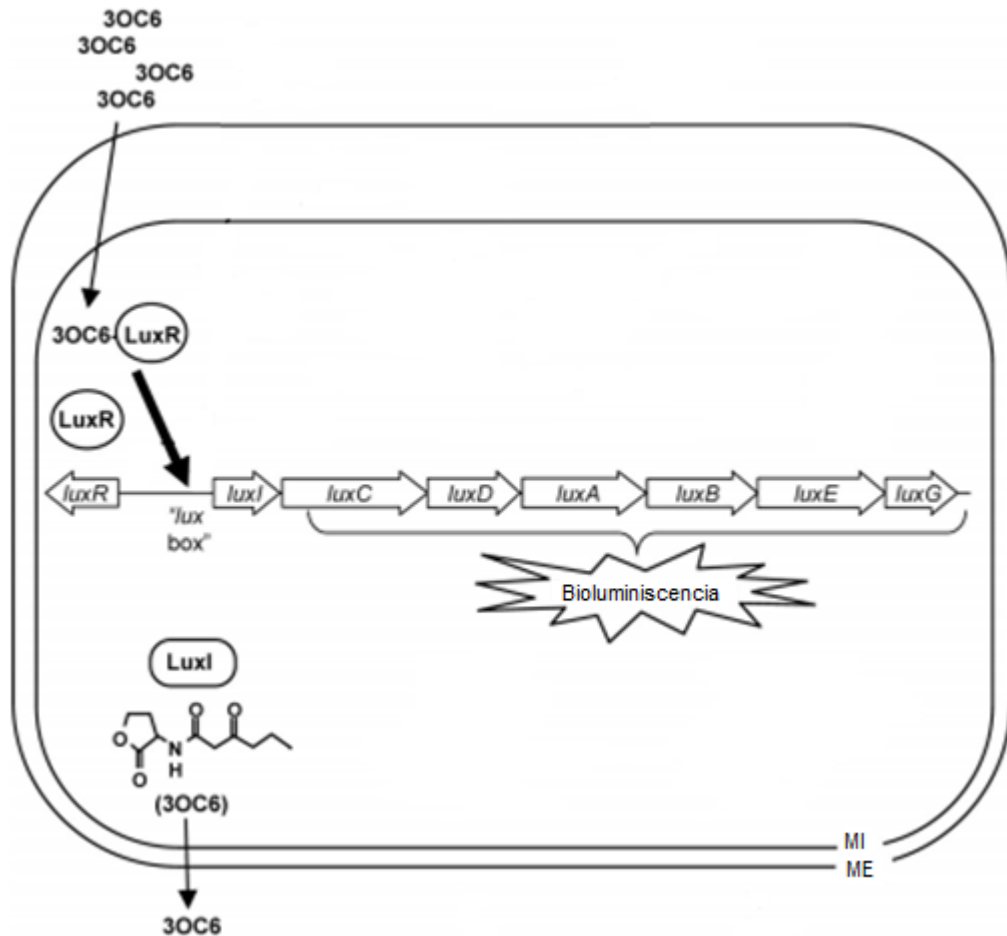


Figura 2 Esquema simplificado del sistema de percepción de quórum Lux. Modelo modificado de la regulación de la bioluminiscencia mediada por autoinductores en *Vibrio fischeri* (Lyell et al., 2010). Abreviatura: 3OC6 (N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C6HSL)), MI membrana interna, ME membrana externa.

El principio de los sistemas de percepción de quórum es que de manera basal el autoinductor es sintetizado y difundido al medio extracelular, cuando hay baja densidad bacteriana esta señal se encuentra diluida, mientras que al aumentar la cantidad de células, la concentración extracelular de esta señal aumenta hasta alcanzar una concentración adecuada para ingresar de nuevo a la célula y unirse a la proteína receptora específica. El complejo autoinductor-receptor es lo que

activa la transcripción de genes específicos. El autoinductor es el que permite la comunicación célula a célula y así mismo la percepción del quórum y el cambio de comportamiento de individuo a población (Van Delden et al., 1998).

Entre las particularidades de los sistemas de percepción de quórum, está que el gen con más sensibilidad a la activación por el complejo autoinductor-receptor es el gen que codifica para la sintasa del autoinductor. De esta manera la célula es capaz de aumentar rápidamente la cantidad de autoinductor y por lo tanto, también los productos de la transcripción de los genes bajo su influencia (Van Delden et al., 1998).

Los sistemas de percepción de quórum y por lo tanto, los genes controlados por estos sistemas están en su mayoría relacionados con la capacidad que tienen las bacterias para adaptarse al medio externo, aumentar su competitividad frente a otras especies de microorganismos y superar algunos mecanismo de defensa del huésped en los casos de infección (Van Delden et al., 1998; Smalley et al., 2015).

3.2.1. Sistema de *quorum sensing* Las

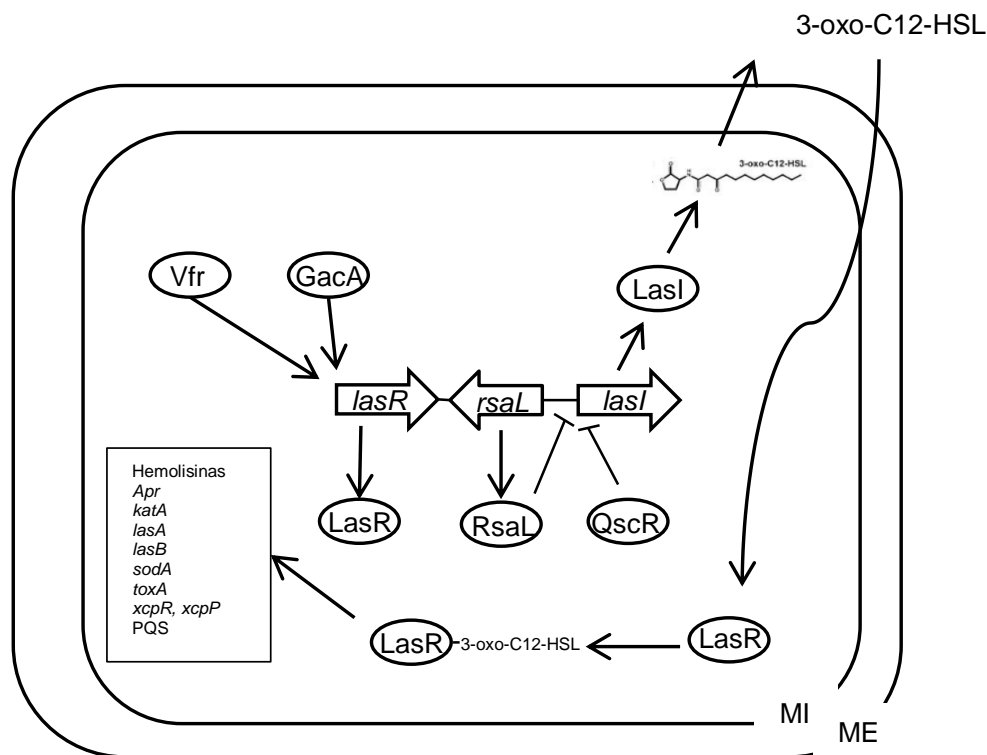


Figura 3 Esquema simplificado del sistema de quórum Las en *Pseudomonas aeruginosa*. Abreviatura: 3-oxo-C6HSL (N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona), MI membrana interna, ME membrana externa.

En *P. aeruginosa* el primer sistema de percepción de quórum que se describió fue el sistema Las. Este nombre le fue asignado ya que se vinculó con la regulación de la expresión de la enzima elastasa (codificada por *lasB*). Este sistema está integrado por *lasI*, que codifica para la sintasa del autoinductor, *lasR*, que codifica para la proteína receptora (activador transcripcional) y por el autoinductor (3-oxododecanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C12-HSL) perteneciente a la familia de las acil homoserín lactonas (Figura 3). *lasB* (elastasa) no es el único gen que está regulado por este sistema, también lo están genes como *lasA* (elastasa A), *aprA* (proteasa alcalina), *pvd*, *xcpP* y *xcpR* (proteínas componentes del sistema de secreción tipo II) y *toxA* (exotoxina A), entre otros (Figura 3) (Van Delden et al., 1998; Whiteley et al., 1999). El sistema Las a su vez también es controlado positivamente por proteínas como GacA y Vfr, cuya presencia es necesaria para la transcripción de *lasR* (Schuster et al., 2006). Mientras que *rsaL* y *qscR* codifican para inhibidores de este sistema al reprimir la transcripción de *lasI* (Figura 3) (Van Delden et al., 1998; Dubern et al., 2008).

3.2.2. Sistema de quorum sensing Rhl

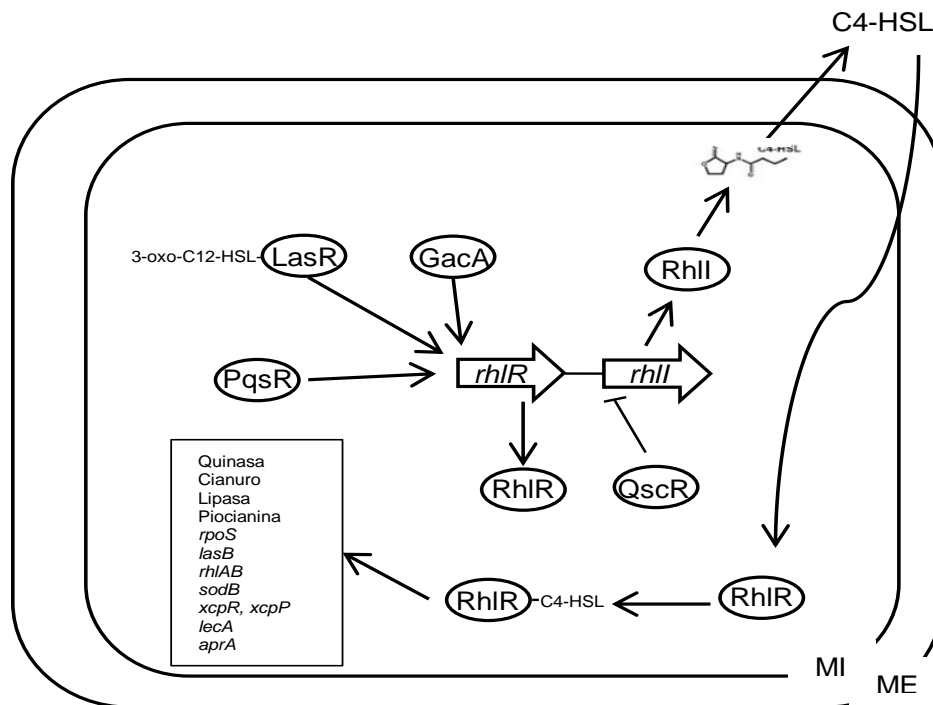


Figura 4 Esquema simplificado del sistema de quórum Rhl en *P. aeruginosa*. Abreviatura: C4-HSL N-butilil-homoserín lactona, MI membrana interna, ME membrana externa.

El segundo sistema de quórum descrito en *P. aeruginosa* fue el sistema Rhl, cuyo nombre fue designado por tener un efecto en la regulación de la producción de ramnolípidos (rhamnolipids en inglés). Este sistema está compuesto

del mismo modo que el sistema Las, por la sintasa del autoinductor RhII, el autoinductor (N-butiril)-homoserín lactona (C4-HSL) y la proteína receptora RhIR (Figura 4). El sistema Rhl aparte de controlar la producción de los ramnolípidos también está involucrado en la síntesis de fenazinas (*phzA-G*) y más específicamente de piocianina (*phzM*), cianuro (*hcnC*), quitinasa (*chiC*) y ayuda a la síntesis de elastasa LasA y LasB, proteasa alcalina (*aprA*), y participa en la regulación para la formación de biopelícula. Este sistema también regula la transcripción del factor sigma S (*rpoS*) de fase estacionaria que a su vez regula otros genes involucrados con la respuesta a estrés (Van Delden et al., 1998; Hassett et al., 1999).

3.2.3. Sistema de quorum sensing Pqs

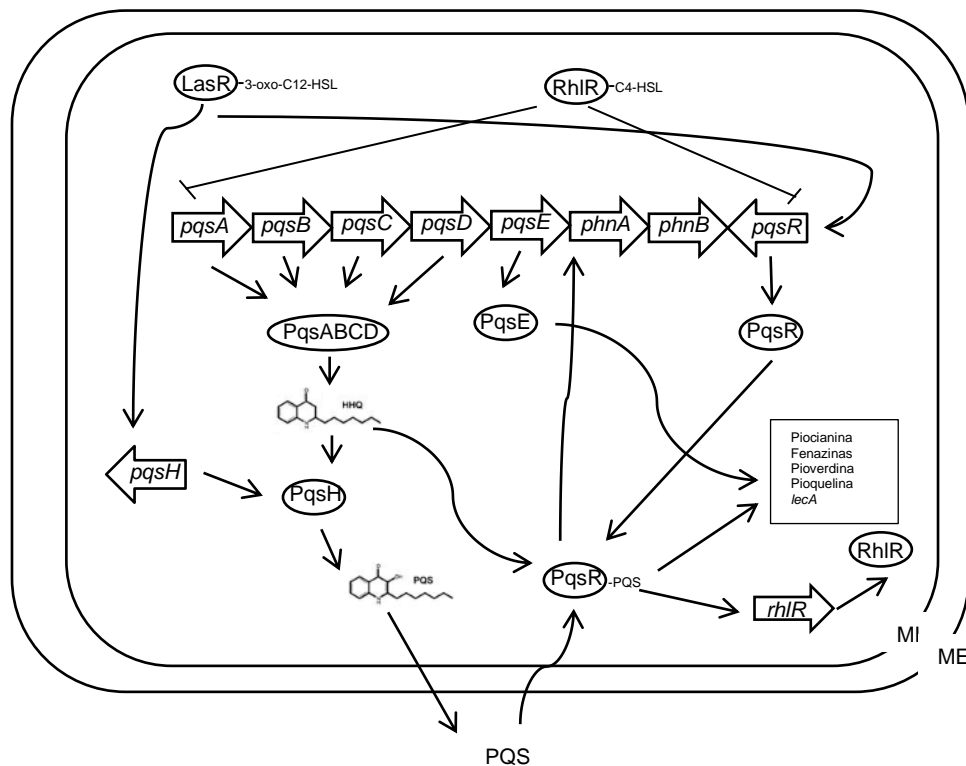


Figura 5 Esquema simplificado del sistema de quórum Pqs en *P. aeruginosa*. Abreviatura: 3OC6 (N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C6HSL)), C4-HSL N-butiril-homoserín lactona, PQS 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, HHQ 2-hetil-4(1H)-quinolona, MI membrana interna, ME membrana externa.

Este sistema es uno de los más recientes en ser descubierto y al igual que los otros dos sistemas recibe su nombre por el primer metabolito que se describió está controlado por este el, es decir, las quinolonas. Este sistema cuenta con dos autoinductores que en este caso son 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) y 2-heptil-4(1H)-quinolona (HHQ) y un regulador transcripcional *mvfR* (*pqsR*). Pero a diferencia de los otros dos sistemas de QS presentes en *P. aeruginosa*, los genes implicados en la síntesis de los autoinductores no son similares a los del sistema

Lux, ya que en este caso intervienen más de un gen para su síntesis, *phnA* (*trpE*), *phnB* (*trpG*), *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, *pqsD*, *pqsE* y *pqsH* (Figura 5) y además la liberación de los autoinductores se lleva a cabo en la fase exponencial tardía mientras que la de los otros dos autoinductores es en la fase exponencial temprana (Wade et al., 2005).

El gen *mvfR* o *pqsR* participa en la regulación de los genes dependientes del sistema Rhl, sugiriendo que los sistemas Pqs y Rhl son paralelos y actúan sobre los mismos genes (Schuster et al., 2006).

Ninguno de los sistemas de *P. aeruginosa* (Las, Rhl, Pqs y lqs) es completamente independiente del otro. El complejo 3-oxo-C12-HSL-LasR es requerido para la expresión de *pqsH* y regula positivamente a *pqsR*. El sistema Rhl es influenciado también por el complejo 3-oxo-C12-HSL-LasR activando su expresión y a su vez la unión de 3-oxo-C12-HSL-RhlR puede bloquear la unión con su correcto autoinductor (C4-HSL). A su vez, el sistema Pqs es influenciado por el sistema Rhl especialmente los genes *pqsA* y *pqsR*, los cuales son reprimidos por el complejo C4-HSL-RhlR (Van Delden et al., 1998; Whiteley et al., 1999; Dubern et al., 2008). Estos cuatro sistemas de comunicación están íntimamente ligados dando como resultado una gran cadena de comunicación intercelular, la cual ayuda para la adaptación rápida a los estreses a los que puede ser sometida esta bacteria.

En *P. aeruginosa* los sistemas de *quorum sensing* regulan alrededor del 6-10% de los genes presentes en esta bacteria (Chan et al., 2015).

3.3. Bienes públicos

Los productos que son secretados al exterior de la célula para llevar a cabo su función, se les conoce como bienes públicos es decir, estos bienes están compartidos entre la población completa, ya que cualquier individuo puede utilizarlos hasta los que no ayudaron en el proceso de producción e incluso individuos de otra especie. Estos productos son controlados por los sistemas de *quorum sensing* presentes en *P. aeruginosa*, es decir, su producción depende de la densidad de población y cumplen funciones de cooperación entre las poblaciones (Smalley et al., 2015).

P. aeruginosa cuenta con una gran cantidad de bienes públicos entre los que se encuentran: proteasas (aminopeptidasas, *aprA*, *lasA*), elastasa LasB, exotoxinas (*toxA*), exoenzimas (*exoT*, *exoY*, *exoS*), fosfolipasa (*plcH*), hemolisinas, endonucleasas (*endA*), adhesinas, quitinasas, lectinas (*lecA*) y sideróforos (pioverdina *pvdF* y pioquelina *pchD*). Algunos de estos exoproductos son también factores de virulencia ya que son los responsables de los daños en los huéspedes en casos de infección (Rumbaugh et al., 2009; Moradali et al., 2017). Los exoproductos con más relevancia en este proyecto son enlistados a continuación.

- Proteasa alcalina

La proteasa alcalina es una metaloproteasa dependiente de zinc; colagenasa extracelular que contribuye a la obtención de nutrientes ya que corta proteínas en péptidos y aminoácidos y las bacterias ocupan estos residuos para su crecimiento y reproducción (Iiyama et al., 2017). Su síntesis es dependiente del quórum y principalmente del sistema Rhl. El gen responsable de su síntesis es *aprA* (Pearson et al., 1997).

Este factor de virulencia es importante en las infecciones ya que es el encargado de romper algunos componentes del tejido conectivo y pulmonar, como el colágeno e interfiere con algunos factores del sistema inmune como lo son el interferón gama (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), para disminuir la respuesta inmune del huésped (Iiyama et al., 2017).

- Elastasa

Es una endopeptidasa extracelular, metaloproteasa dependiente de zinc al igual que la proteasa alcalina. El gen responsable de su síntesis es *lasB* y la inducción de este gen es debido a la activación de los sistemas de quórum Las (directamente), Rhl y Pqs (indirectamente) (Pearson et al., 1997). Es capaz de degradar la elastina y el colágeno. Durante las infecciones este factor de virulencia es el encargado de inactivar la inmunoglobulina G (IgG) y muchos componentes del complemento (Bever et al., 1988). También debido a su actividad elastolítica es capaz de degradar el tejido conectivo del sitio de infección (Olson et al., 1992).

3.4. *Cheaters* o Tramposos

En las poblaciones y sobre todo cuando existe la producción de exoproductos, los individuos incapaces de producir estos bienes públicos pero que sí son capaces de utilizarlos, se pueden aprovechar este beneficio a costa de los individuos productores. Estos individuos reciben el nombre de *cheater*, oportunista o tramposos (Mellbye et al., 2011). Los *cheaters* pueden ser individuos de la misma especie que los individuos productores o de una especie diferente.

El crecimiento o la aparición de estos individuos tramposos, se favorece cuando reciben un beneficio por la presencia de los bienes públicos, al ser estos necesarios para la obtención de factores de crecimiento o nutrientes, ya que estos bienes pueden ser ocupados por ellos. Mientras que también se puede limitar su crecimiento y aparición cuando las condiciones de crecimiento dependen de bienes privados (como enzimas intracelulares), que son generados exclusivamente por los individuos productores y solo ellos reciben el beneficio de su producción. Un ejemplo claro de un bien privado es Nuh, una nucleósido hidrolasa capaz de degradar adenosina para utilizarla como fuente de carbono. Su síntesis dependiente del sistema de quórum Las. Esta enzima se ubica en el periplasma de las células por lo que su acción solo favorece a las células productoras (Heurlier et al., 2005).

El problema que experimentan las poblaciones en cultivos donde es necesaria la producción de bienes públicos para la obtención de fuentes de carbono o algún cofactor esencial para el crecimiento, es que la población de individuos *cheaters* presentes o que surgieron con el tiempo invaden las poblaciones, debido a que no producen los bienes públicos y evaden el costo de su producción, lo que hace que la obtención de su energía este enfocada solo al crecimiento y por lo tanto, crecen más rápido que los individuos que tienen que producir los bienes públicos (Harrison et al., 2006; Sandoz et al., 2007; Smalley et al., 2015; Wang et al., 2015 a). Al invadir las poblaciones la cantidad de individuos productores se va disminuyendo y así mismo la cantidad del autoinductor como también la de los bienes públicos y por lo tanto, se genera una disminución del crecimiento de toda la población en general y un posterior colapso social (Mellbye et al., 2011).

En el caso de *P. aeruginosa*, los individuos no cooperadores o *cheaters*, su existencia se debe en su mayoría a mutaciones en los sistemas de quórum o específicamente en las enzimas que sintetizan los exoproductos de los cuales están recibiendo el beneficio. Cuando las mutaciones son en referencia a los sistemas de quórum, pueden existir varios tipos de mutantes: aquellos que no produzcan la señal (el autoinductor) y aquellos que no perciban la señal es decir, sin el receptor del autoinductor. La diferencia entre estos individuos es su respuesta ante los estímulos, por ejemplo, en individuos incapaces de sintetizar el autoinductor, su respuesta en presencia al autoinductor agregado de forma artificial, será la activación del sistema de quórum, ya que ese individuo aún cuenta con el receptor necesario para la activación. Mientras tanto, un individuo sin la molécula receptora del autoinductor será incapaz de activar su sistema de quórum, no importando si cuenta o no con la presencia del autoinductor. En este último caso también se presenta otro fenómeno importante, porque este individuo aún cuenta con la sintasa del autoinductor y por lo tanto, es capaz de fomentar la activación de los sistemas de quórum de las bacterias periféricas provocando la producción de bienes públicos dependientes de quórum por parte de los individuos cooperadores (Diggle et al., 2007; Rumbaugh et al., 2009; Smalley et al., 2015).

Los mutantes con actividad *cheater* más comunes en *P. aeruginosa* son $\Delta lasR$, que carecen del receptor del autoinductor 3-oxo-C12-HSL y a este sistema de QS se le conoce como el de mayor jerarquía e injerencia en los otros dos sistemas, por lo que al carecer de este, la disminución de los factores de virulencia sería global (sistemas Las, Rhl y Pqs). Se ha comprobado que estas mutantes pueden surgir en poblaciones donde inicialmente se encuentran individuos cooperadores, sobre todo cuando el crecimiento está relacionado con la percepción de quórum y específicamente la producción de factores extracelulares (Smalley et al., 2015). En algunos casos se muestra una restauración espontánea de la actividad necesaria para el crecimiento por parte de las mutantes pero no necesariamente de todo el sistema involucrado (Sandoz et al., 2007; Wang et al., 2015 a).

En una infección este comportamiento tiene mucha relevancia en el proceso de virulencia, ya que los encargados de generar esta reacción son en su mayoría

exoproductos, que a su vez son dependientes del quórum y producidos únicamente por los individuos cooperadores. Por lo que en infecciones con un solo tipo de mutante de los principales sistemas de QS (sistema Las: $\Delta lasI$ o $\Delta lasR$ y sistema Rhl: $\Delta rhII$ o $\Delta rhIR$), se ha observado que la virulencia y también la tasa de mortalidad de los individuos infectados, están disminuidas en referencia con infecciones de individuos cooperadores. Sin embargo, se han aislado estos mutantes de infecciones clínicas confirmando la coexistencia de estas dos poblaciones de manera natural. Además, se ha examinado si la presencia de estos *cheaters* en diferentes proporciones disminuye la virulencia de la infección, y se comprobó en modelos murinos de infección que en estos casos también está disminuida la virulencia y la tasa de mortalidad (Smith et al., 2003; Harrison et al., 2006; Rumbaugh et al., 2009). También en infecciones cuando se inició con una mezcla de poblaciones, se observó que los *cheaters* tienden a aumentar su proporción inicial, esto es debido a la evasión del costo de la activación de los sistemas de quórum, y es más evidente sí el crecimiento es dependiente del quórum. El aumento excesivo en la población *cheater* acarrearía un desplome en el crecimiento de toda la población, por la disminución de los bienes públicos y esto se observó en algunos experimentos, pero en otros se observó que el aumento de la población *cheater* estaba limitado, por lo que se hipotetizó en un control por parte de los individuos cooperadores para regular el aumento de la población *cheater* (Wang et al., 2015 b).

En caso de una selección entre estas dos poblaciones (cooperadores y *cheaters*) para mantener un control, es importante mencionar que los individuos cooperadores se consideran más resistentes ya que cuentan con la activación correcta de los sistemas de quórum y por lo tanto, la producción tanto de bienes públicos como privados que implican un beneficio en diferentes situaciones. Por lo tanto, en alguna situación de estrés, este puede ejercer una presión selectiva.

3.5. Selección de poblaciones

3.5.1. Estréses externos

Una de las estrategias que podría evitar la propagación excesiva de los individuos no cooperadores o *cheaters* en las poblaciones, está basada en la hipótesis de que estos individuos son más sensibles a los estrésés ambientales, lo que podría generar una ventaja a favor de los cooperadores cuando los *cheaters* son de otras especies y una protección contra el *cheating* por parte de los individuos de la misma especie (Smalley et al., 2015).

Entre los estrésés que se han evaluado están el osmótico, la presencia de antibióticos, metales pesados (cadmio), quelantes e inhibidores del metabolismo y en todos los casos los individuos cooperadores presentaron una mejor resistencia que los *cheaters*. En este caso los individuos pertenecían a la misma especie (García-Contreras et al., 2015).

Otro estrés que se ha evaluado es el oxidativo y se considera una de las principales condiciones que se han utilizado para la selección de poblaciones. Recordemos que *P. aeruginosa* se encuentra con mayor frecuencia en ambientes aerobios, por lo que la defensa contra el estrés oxidativo es muy importante. Los individuos cooperadores, debido a su metabolismo favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de metabolitos secundarios y el propio metabolismo, pero también cuentan con la presencia de genes que codifican para enzimas que contrarrestan este estrés, lo que se considera una ventaja y también una mayor resistencia sobre otros organismos.

P. aeruginosa posee dos superóxido dismutasas, una cuyo cofactor es el hierro (Fe-SOD) (*sodB*) y otra cuyo cofactor es el manganeso (Mn-SOD) (*sodA*) y también cuenta con dos catalasas que contienen grupos hemo (*katA* y *katB*) (Hassett et al., 1999). En varios experimentos se comprobó que mutantes de estas enzimas y también mutantes de los sistemas de quórum Las y Rhl son más sensibles al estrés oxidativo. Inclusive las biopelículas producidas por estos individuos también son afectadas por este estrés, ya que son más propensas a ser destruidas por este (Hassett et al., 1999; Davies et al., 2007). La sensibilidad de los individuos deficientes de quórum se debe a la deficiencia en la respuesta contra el estímulo, principalmente la expresión de enzimas antioxidantes que ayudan a combatir las especies reactivas de oxígeno y la formación de una biopelícula adecuada (Hassett et al., 1999; García-Contreras et al., 2015).

Otro beneficio que presentan las células con los sistemas de quórum activos es la producción de alginato. La producción de alginato está favorecida por la disminución de nutrientes, la osmolaridad elevada y especialmente la presencia de oxígeno. *P. aeruginosa* es capaz de crecer en ausencia de oxígeno, debido a la presencia de enzimas que son capaces de utilizar nitrato, nitrito y óxido nitroso como último aceptor de electrones sustituyendo al oxígeno, el cual es utilizado en condiciones aeróbicas. También es capaz de utilizar arginina, fermentándola mediante la fosforilación a nivel de sustrato (Hassett et al., 1996). La producción de alginato en estas condiciones es menor que en aerobiosis. Por lo tanto, la presencia de alginato podría ser otro factor que ayude a la disminución de *cheaters* ya que ofrece una mejor adaptación en condiciones anaeróbicas.

3.5.2. Estreses internos

Para mantener el equilibrio de estas poblaciones (cooperadores y no cooperadores), otra posible forma de restricción por parte de los individuos cooperadores es controlar el surgimiento de los individuos tramposos mediante la producción de compuestos para “castigarlos” (Wang et al., 2015 a). Al igual que los exoproductos, las bacterias también regulan la producción de compuestos llamados antimicrobianos a través de los sistemas dependientes de quórum, generando una ayuda en las competencias por los recursos con otras especies y especialmente generando protección contra el uso oportunista de sus

exoproductos (Smalley et al., 2015). Además, otra forma de restricción del aumento de la población no cooperadora es la presencia de bienes privados, que solo favorecen a los productores como la presencia de enzimas membranales que ayuden a la obtención de alimentos o a combatir estreses.

Diversos estudios han observado como estos compuestos son capaces de eliminar selectivamente o limitar el crecimiento de los individuos no cooperadores. Esto basado en la susceptibilidad por parte de los individuos tramposos. Los principales compuestos que se han estudiado se muestran a continuación.

- Ramnolípidos

Los ramnolípidos son compuestos glucolípidicos biosurfactantes que contiene ramnosa con una estructura similar a la de los detergentes y su principal función en infecciones es solubilizar los fosfolípidos del surfactante pulmonar, haciéndolos más accesibles a la acción de la fosfolipasa C (Van Delden et al., 1998; Xavier et al., 2011). Este factor de virulencia también está involucrado en la formación de biopelículas y en la motilidad de la bacteria, especialmente en el fenómeno de *swarming*; además de ser considerado un metabolito secundario ya que es producido en el inicio de la fase estacionaria del crecimiento (Soberón-Chávez et al., 2005; Moradali et al., 2017). La síntesis de este factor de virulencia es dependiente del sistema de quórum Rhl y los genes involucrados en su síntesis son *rhlA* que codifica para una enzima que usa intermediarios de la síntesis de ácidos grasos para producir ácido 3-(3-hidroxicanoiloxi) alcanóico (HAA) que es el lípido precursor de los ramnolípidos, *rhlB* y *rhlC* son los genes que adicionan la ramnosa generando mono y di-ramnolípidos respectivamente.

Este metabolito secundario también podría ser considerado un bien público ya que se ha comprobado que puede ser utilizado por mutantes deficientes en su producción (*rhlA*) para generar *swarming*, solo en este caso no se presenta como tal el fenómeno de *cheating* ya que al cultivarlas juntas no hay un aumento en la población mutante como en los casos conocidos de *cheating*, sino que las poblaciones mantienen constantes con las proporciones iniciales. Esto se debe a que la producción de ramnolípidos está ligada a la cantidad de fuente de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo, es decir, que esta bacteria regula la expresión de *rhlAB* para asegurar que los ramnolípidos se produzcan solo cuando la fuente de carbono exceda la necesaria para el crecimiento, debido a esto hace que sea menos probable el crecimiento de individuos oportunistas a costa de los cooperadores, sugiriendo que la secreción de ramnolípidos se produce solo cuando no se afecte el crecimiento, es decir, en fase estacionaria lo que también está relacionado con la activación del quórum, ya que en estas condiciones las concentraciones necesarias para su activación están presentes (Xavier et al., 2011).

Sin embargo, cuando *P. aeruginosa* es cultivada con otros microorganismos la actividad surfactante de los ramnolípidos está relacionada con la toxicidad y sobre todo representa una ventaja sobre los otros. Se ha demostrado que los

ramnolípidos tienen actividad antibacteriana mayoritariamente en contra de bacterias Gram positivas y también posee actividad contra otros microorganismos (Soberón-Chávez et al., 2005). La ventaja de *P. aeruginosa* sobre estos organismos se da a partir de la misma producción de los ramnolípidos ya que en el proceso de síntesis como metabolito de desecho se forman moléculas de lipopolisacárido (LPS) y también fenotípicamente muestra una textura mucóide provocada por la sobreproducción de exopolisacárido que le confieren una mejor barrera física contra estreses externos.

- Cianuro de hidrógeno

El cianuro de hidrógeno (HCN) es sintetizado por *P. aeruginosa* ya que en su genoma esta cuenta con los genes *hcnA*, *hcnB* y *hcnC*, que codifican para enzimas involucradas en su síntesis. Ese metabolito secundario es regulado por el sistema de quórum Rhl y se ha observado que también por el regulador anaeróbico Anr (regulador transcripcional que se convierte a su forma activa en concentraciones bajas de oxígeno) y por los reguladores globales RsmA y *rpoS* (Pessi et al., 2001). Se produce en mayor cantidad en la transición de la fase exponencial a la estacionaria y bajo condiciones de oxígeno limitado, ya que las sintetasas responsables de su producción son sensibles a oxígeno; este proceso también es inhibido en completa anaerobiosis, sobre todo cuando se utilizan nitratos como último aceptor de electrones (Castric, 1994; Pessi et al., 2000; Smalley et al., 2015). Este factor de virulencia se considera veneno y uno de los principales agentes antimicrobianos por su efecto inhibitorio en la cadena respiratoria (principalmente sobre las citocromo c oxidasa y una gran variedad de metaloenzimas). El efecto frente a otros microorganismos se ha observado sobre todo en cultivos mixtos entre *P. aeruginosa* y *Burkholderia multivorans* (Smalley et al., 2015) y también en cultivos con individuos tramposos de su misma especie (mutantes $\Delta lasR$) (Wang et al., 2015 a). Las ventajas que presentan los individuos resistentes a cianuro frente a los sensibles es probablemente la activación dependiente de quórum de una citocromo oxidasa libre de hierro resistente a cianuro (*cioAB*), una reductasa ferredoxin NADP⁺-dependiente (*fprA*), una enzima rodanasa (*rhdA*), con actividad de tiosulfato sulfuro-transferasa que convierte el cianuro en un compuesto menos tóxico como el tiocianato en presencia de tiosulfato y un operón de seis genes aún con función inespecífica (PA4129-PA4134); incluyendo el efecto inductor del HCN que activa en conjunto todos estos genes para inducir la resistencia a cianuro (Hassett et al., 2011; Frangipani et al., 2014).

3.6. Fenazinas y Piocianina

Las fenazinas son compuestos heterocíclicos biológicamente activos. La producción de la mayoría de estos compuestos representa una ventaja sobre otros organismos, ya que ayudan a la supresión de patógenos de plantas en el suelo y son uno de los principales factores de virulencia en infecciones en humanos y animales (Mavrodi et al., 2001 a; Dietrich et al., 2006). En infecciones pulmonares

se ha observado que las fenazinas pueden estimular la atracción de neutrófilos mediante la secreción de quimiotaxinas por parte de los macrófagos presentes en los alveolos, lo que provoca un aumento en la respuesta inflamatoria y daño al tejido pulmonar provocado por los neutrófilos (Mavrodi et al., 2001 b). Su actividad está principalmente asociada a su capacidad redox en presencia de varios agentes reductores y oxígeno molecular, produciendo compuestos como superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que son tóxicos para algunas células provocando lesiones y eventualmente la muerte celular (Mavrodi et al., 2001 b).

P. aeruginosa produce al menos cuatro fenazinas: ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), 1-hidroxifenazina (1-OH-PHZ), fenazina-1-carboxamida (PCN) y piocianina (Mavrodi et al., 2001 b). Los genes necesarios para la síntesis de estas fenazinas se encuentran en dos operones homólogos que contienen siete genes (*phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzA2B2C2D2E2F2G2*) responsables de la producción de PCA y tres genes que codifican para enzimas únicas implicadas en la conversión de PCA a piocianina (*phzM*), a PCN (*phzH*) y a 1-OH-PHZ (*phzS*) (Figura 7) (Mavrodi et al., 2001 b; Dietrich et al., 2006). Los genes *phzM* y *phzS* flanquean al operón *phzA1-G1*, mientras que *phzH* se encuentra en un sitio distinto. La distancia entre los dos operones es de aproximadamente 2.6Mb (Figura 6) (Recinos et al., 2012).

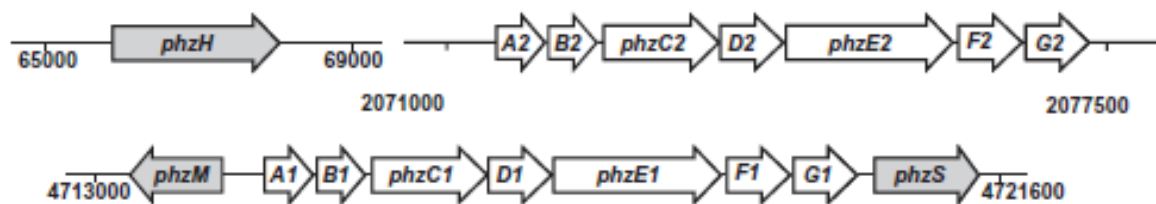


Figura 6 Localización genómica de los genes *phz* en *P. aeruginosa* (Dietrich et al., 2006).

Las fenazinas son producidas por *P. aeruginosa* principalmente durante la fase estacionaria y su síntesis está regulada como se explicó anteriormente por los sistemas de quórum Rhl y Pqs, que a su vez están regulados por el sistema de quórum Las; también el sistema de regulación global de dos componentes GasA-GacS está asociado con su regulación (Mavrodi et al., 2001 b) y actualmente se ha estudiado que la presencia de quinolonas también ejerce un control sobre la producción de fenazinas, sobretodo de PCA. Adicionalmente existe una selección entre los dos operones, ya que el operón *phzA1-G1* cuenta con una región promotora que presenta “cajas Las-Rhl”, que favorece su transcripción sobre el operón *phzA2-G2*, mientras que en la región río arriba del operón *phzA2-G2* se encuentra *qscR* que codifica para una proteína que regula negativamente la expresión de varios genes controlados por el quórum reprimiendo los genes regulados por Las, incluyendo a *phzA1-G1*. La presencia de estas dos regiones antes de los operones permite la regulación y modulación de la cantidad de

fenazinas producidas, dependiendo de los estímulos exteriores (Mavrodi et al., 2001 b; Recinos et al., 2012).

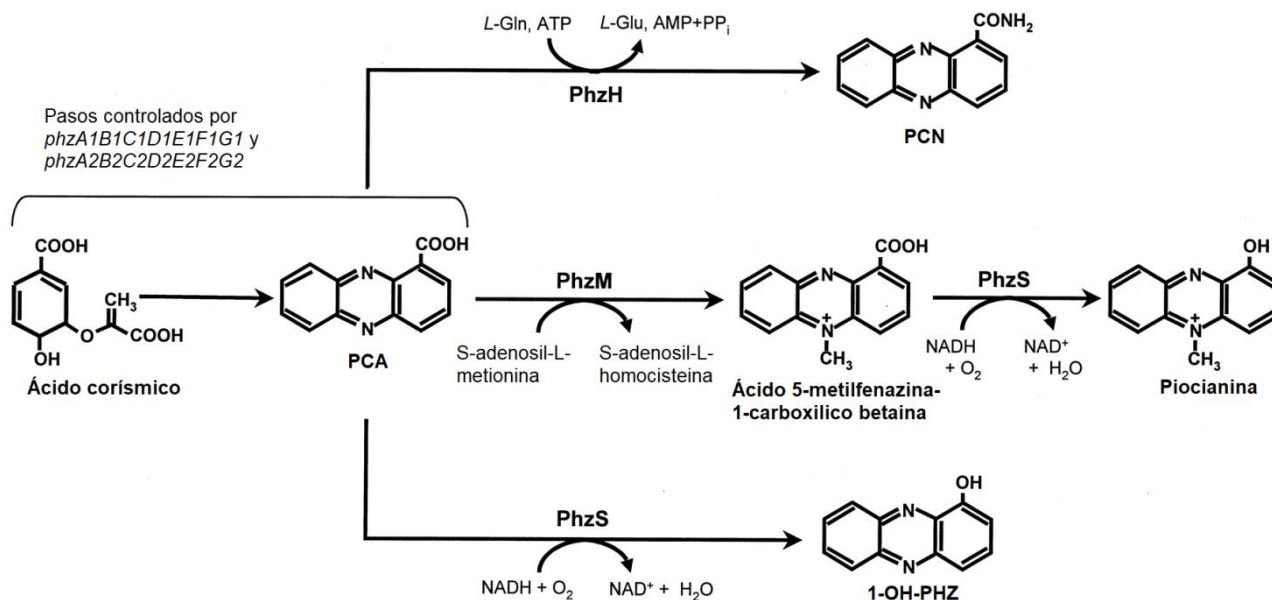


Figura 7 Esquema propuesto para la formación de fenazinas en *P. aeruginosa* (Mavrodi et al., 2001 b). Abreviaturas: L-Gln Glutamina, ATP Adenosín trifosfato, AMP Adenosín monofosfato, PPi Pirofosfato inorgánico, PCN Fenazina-1-carboxamina, NADH/NAD⁺ nicotinamida a denina dinucleótido y 1-OH-PHZ 1-hidroxifenazina.

La pocianina (N-metil-1-hidroxifenazina) es sintetizada a partir de PCA y por medio de la enzima codificada en el gen *phzM*. La transcripción de estos genes, tanto de los operones *phzA1/2-G1/2* como de *phzM* están reguladas por el sistema de quórum Rhl. Su síntesis se favorece cuando *P. aeruginosa* es cultivada en medios que contengan una fuente de aminoácidos como peptona y principalmente en presencia de alanina mientras que en altas concentraciones de fosfato su síntesis se ve inhibida (El-Fouly et al., 2015).

La pocianina es un pigmento azul soluble en cloroformo con actividad redox. Es capaz de existir en forma oxidada y reducida. Puede ser reducida por las peroxidases o de forma no enzimática por NAD(P)H. En su forma reducida es un radical inestable que reacciona rápidamente con el oxígeno molecular, esta reacción genera la formación del ion superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y en presencia de catalizadores también puede llegar a formar el radical hidroxilo (HO⁻) (Reszka et al., 2004; Hassett et al., 2011).

P. aeruginosa es beneficiada por la producción de fenazinas ya que actúan como señal intracelular, ayudan a mantener el equilibrio redox e incluso aumentan la obtención de hierro (Dietrich et al., 2006; Recinos et al., 2012).

Sudhakar y colaboradores sugieren que la producción de estos radicales tóxicos son los responsables de su capacidad bactericida contra diversos microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp,

Klebsiella spp, *Agrobacterium tumefaciens* y *Burkholderia thailandensis*, entre muchos otros y comprueban que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a sus efectos (Sudhakar et al., 2015).

La piocianina además de ser considerada un agente antimicrobiano tiene la capacidad de causar lesiones en tejidos animales, esto mediante un desacoplamiento en el flujo de electrones de las vías biológicas, como la respiración celular, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conlleva a la muerte celular. Esto se ha visto sobre todo en infecciones pulmonares donde la concentración de oxígeno es más elevada y por tanto hay más probabilidad de que la formación de ROS se lleve a cabo (Reszka et al., 2004). También interfiere con la regulación del transporte iónico, la frecuencia del latido ciliar y la secreción de moco en las células epiteliales de las vías respiratorias al alterar la concentración citosólica de calcio (Mavrodi et al., 2001 b), y se ha demostrado que en células tumorales interfiere con la acción de las topoisomerasas I y II (El-Fouly et al., 2015). Es importante mencionar que este pigmento se encuentra presente en el 90-95% de los aislados de *P. aeruginosa* y que en el esputo de pacientes con fibrosis quística se han determinado concentraciones elevadas de este compuesto, sugiriendo su importancia para la colonización y la virulencia (Mavrodi et al., 2001 b).

4. JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia dependientes de la activación de los sistemas de quórum, que a la vez son dependientes de la densidad celular. Algunos de estos factores pueden ser utilizados por *cheaters* que no ayudan en el proceso de producción. Los *cheaters* al evadir el costo de los productos de los cuales se benefician, aumentan su frecuencia con mayor velocidad que la de los productores. Por lo tanto, es necesario mantener un control sobre la presencia de los *cheaters*, para evitar un desequilibrio entre el crecimiento de la población y los recursos en el ambiente. La sensibilidad a los estreses por parte de los *cheaters* en una desventaja que los cooperadores utilizan para el control de las poblaciones tramposas. Con base en esto, en este proyecto se propone la detección de uno de los factores de virulencia producidos por los individuos cooperadores que se cree ayuda al control de los individuos no cooperadores y también el probable mecanismo de acción.

5. HIPÓTESIS

En cultivos con poblaciones donde individuos cooperadores y no cooperadores coexistan y estos sean expuestos a estrés biótico (la presencia de factores de virulencia), la población cooperadora se seleccionará sobre la no cooperadora.

6. OBJETIVO

Estudiar la influencia del estrés biótico (piocianina, producida por *Pseudomonas aeruginosa* con sistemas de quórum activo) sobre la competencia entre células con y sin sistemas de quórum activos (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *A. baumannii*).

6.1. Objetivos específicos:

- Realizar curvas de crecimiento de cultivos puros (*P. aeruginosa* PA14 y $\Delta lasRrhIR$ (fondo PA14), *S. aureus* y *E. coli*) y cultivos mixtos con diferentes proporciones iniciales.
- Cuantificar los factores de virulencia: proteasa alcalina, elastasa y piocianina, en los cultivos puros y mixtos.
- Cuantificar las proporciones de las poblaciones en los cultivos mixtos en ausencia y presencia de estrés (piocianina).
- Determinar el posible mecanismo de acción de la piocianina en los cultivos mixtos.
- Evaluar el efecto del estrés sobre la aparición de individuos no cooperadores.
- Determinar el efecto de la piocianina sobre los sistemas de quórum de *A. baumannii* en cultivos mixtos.

7. METODOLOGÍA

7.1. Cepas utilizadas

7.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

- PA1silvestre (WT) (PA14K) donada por Dr. You-Hee Cho proveniente del Colegio de Farmacia de la Universidad CHA en Corea del Sur (Park, 2005).
- Mutante PA14K $\Delta lasR \Delta rhIR$ ($\Delta lasR \Delta rhIR$) creada por la delección de los genes de los receptores del sistema de quórum Las y Rhl, sin marca (Park, 2005).
- Mutante PA14 *phzM* ($\Delta phzM$) proveniente de la colección del Dr. Frederick Ausubel de la Escuela de Medicina de Harvard, se creó a partir de la inserción de transposones no redundantes al inicio del operón de síntesis de fenazinas interrumpiendo el gen de la metiltransferasa para la biosíntesis de piocianina y cuyo número de identificación es 40343 (Cezairliyan et al., 2013).
- Mutante PA14K sin producción de piocianina ($K\Delta phzM$), esta mutante fue creada para este estudio con la asesoría de la M. en C. Alejandra Abigail González Valdez, a partir de una transducción con el bacteriófago DMS3, con el cual se incorporó la mutación de PA14 *phzM* a la cepa PA14K. Esta cepa tiene resistencia a gentamicina (15 μ g/ml) (Budzik et al., 2004) (véase en Transducción).

7.1.2. *Escherichia coli*

- DH5 α , bacteria no patógena generalmente utilizada para transformaciones, presenta mutaciones en *dlacZ* $\Delta M15$ Δ (*lacZYA-argF*) *U169* *recA1* *endA1* *hsdR17* (*rK-mK+*) *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* que facilitan procesos de clonación. Donada por Dra. Laura Camarena del Instituto de Investigaciones Biomédicas en la UNAM.

7.1.3. *Staphylococcus aureus*

- 50F, aislado clínico de pie diabético, donado por Dr. Rafael García González de la Facultad de Medicina en la UNAM (Cervantes-García et al., 2015).

7.1.4. *Acinetobacter baumannii*

- ATCC 17978 cepa silvestre (WT), donada por Dra. Laura Camarena del Instituto de Investigaciones Biomédicas en la UNAM (Camarena et al., 2010).
- Mutante ATCC 17978 sin *quorum sensing* ($\Delta abal$), carece de la sintasa productora del autoinductor N-(3'-hidroxydodecanoyl)-L-HL por una depleción utilizando el plásmido pMo130, donada por Dra. María Tomas (López et al., 2017). Esta cepa tiene resistencia a kanamicina.

7.2. Medios de cultivo

7.2.1. Medio y placas Luria-Bertani (LB)

El medio LB es un medio de cultivo rico que permite el crecimiento de una gran cantidad de bacterias. Este medio fue utilizado para la preparación de los precultivos, ya que permite el libre crecimiento de todas las cepas utilizadas al no tener restricción alguna en la obtención de la fuente de carbono. Para la preparación de un litro de medio de cultivo se pesaron 10 g NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona, sin ajustar el pH, (caldo) (Roskams et al., 2016 a) y para la preparación de las placas de LB se agregó también 1.2% Agar (Roskams et al., 2009).

7.2.2. Medio de Caseína 0.5% - M9

La utilización de este medio de cultivo fue debido al requerimiento de la presencia de enzimas con actividad proteasa para la degradación de la caseína y su posterior utilización como fuente de carbono. Las enzimas pueden localizarse en la membrana celular (bienes privados) o bien ser expulsadas al medio (bienes públicos). *P. aeruginosa* cuenta con al menos tres exoproteasas capaces de degradar la caseína: elastasa B (*lasB*), proteasa alcalina (*aprA*) y proteasa IV (*prpL*), y son producidas por individuos con sistemas de quórum activos (Caballero et al., 2001). Por lo tanto, este medio de cultivo se eligió para poder observar la utilización de los bienes públicos por parte de la población no productora, es decir, el fenómeno que se conoce como oportunismo social o *cheating*, que se da al obtener beneficios de un compuesto del cual no se ayudó en su elaboración (Diggle et al., 2007).

Para la elaboración de un litro de medio de caseína 0.5%-M9, primero se pesaron 5 g de caseína láctica y se disolvieron en 800ml de agua bidestilada. En 200 ml de agua bidestilada se preparó el amortiguador M9 modificado, agregando 42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.5 mM NaCl y 18 mM NH₄Cl (Roskams et al., 2016 b),

después se agregaron 2 mM MgSO₄ y 0.1 mM CaCl₂. Al final se juntaron las dos soluciones (caseína y M9) para ajustar el pH a 7.0 y después se esterilizó.

7.2.3. Medio de casaminoácidos 0.5%-M9

Este medio de cultivo se utilizó para realizar los controles de las cepas utilizadas y ver su comportamiento en las mismas condiciones que en el medio de caseína, solo que en este caso los nutrientes no estaban sujetos a acción de las proteasas si no que eran accesibles para toda la población.

Para su elaboración se utilizaron los mismos componentes de medio de caseína como el amortiguador M9, las mismas concentraciones de MgSO₄ y de CaCl₂, solo que en este caso se le añadió casaminoácidos en lugar de la caseína (misma proporción), también se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó.

7.2.4. Placas de leche

Las cajas de leche se utilizaron para observar la hidrólisis de la caseína, producida por la acción de exoproteasas presentes por los individuos con sistema de quórum activo. De este modo las colonias de individuos con QS activo estaban rodeadas por un halo transparente mientras que los individuos sin QS no presentaban halo.

En la composición de estas placas se ocupó 200 ml de agua bidestilada para disolver 12 g de leche en polvo (Svelty, Nestle®) y también en 200 ml de agua bidestilada se disolvió 4 g NaCl, 2 g extracto de levadura, 4 g triptona y 1.5% Agar. Las dos soluciones se esterizaron por separado y antes de vaciar en cajas Petri se juntaron asegurándose que se mezclaron homogéneamente.

Todos los medios de cultivo se esterizaron en autoclave a 120 libras/in² de presión y 125 °C por 15 min.

7.3. Condiciones de cultivo

Los cultivos se inocularon con una densidad óptica inicial de 0.05 (600 nm) (aproximadamente $6.67 \times 10^7 \pm 1.67 \times 10^7$ células), en el caso de las competencias, la densidad óptica de 0.05 (600 nm) se tomó como un 100% y según la proporción indicada se inoculó (10, 50 y 90%), todos estos a partir de cultivos en LB con un tiempo de incubación de 12 a 16 h.

Todos los cultivos se incubaron con agitación constante de 200 rpm y a 37°C (THZ 300, Shaking Incubator, HEB, China); también todas las placas se incubaron a 37°C por 24 a 48 h (Incubadora digital 270L, Luzeren, México).

7.3.1. Concentración de proteasa

Los experimentos control para comprobar que las cepas con posible actividad de *cheating* pudieran ser capaces de utilizar las proteínas y aminoácidos productos de las exoproteasas producidas por la cepa PA14K WT, se crecieron en el medio de cultivo de caseína 0.5% y a estos se les agregó proteasa tipo XI de *Streptomyces griseus* (P5147-1G, Sigma-Aldrich) con una concentración final de 0.98 unidades/ ml. Esta concentración fue seleccionada mediante la correlacionando de su actividad con el valor de absorbancia registrada, utilizando el mismo protocolo que para su detección (595 nm) y también se utilizó el de elastasa (495 nm) como control; comprobando que tuvieran valores similares a los obtenidos en los cultivos puros de la cepa WT (Figura 8).

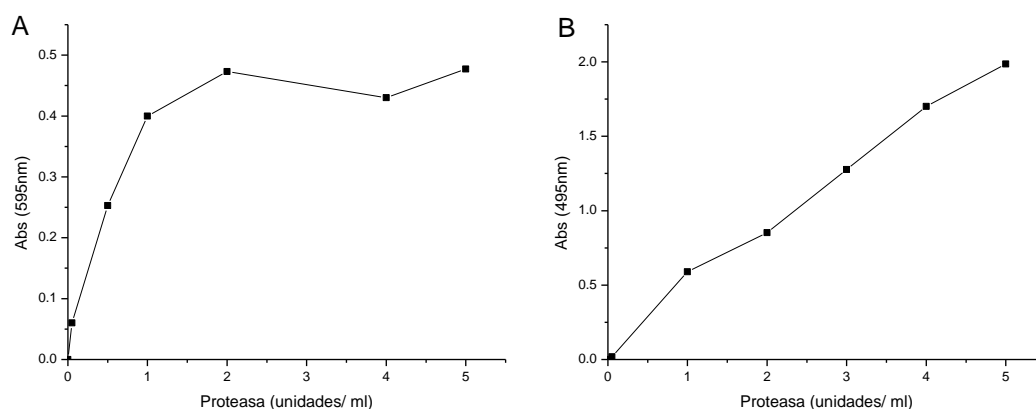


Figura 8 Actividad enzimática de la proteasa tipo XI de *Streptomyces griseus*. A) Protocolo de proteasa alcalina y B) Protocolo de elastasa (n=1).

7.3.2. Concentración de piocianina

En algunos experimentos realizados, se determinó el efecto de la piocianina por lo que esta se añadió a los cultivos. La piocianina fue obtenida mediante una extracción basada en el protocolo para su determinación que se explica posteriormente, al igual que los cálculos para la obtención de su concentración. A diferencia de la extracción para su determinación, en este caso se trató de utilizar la menor cantidad posible de cloroformo y de 0.1N HCl para permitir la concentración de este pigmento en la solución final. Posterior a la extracción se determinó la concentración de una alícuota en una dilución con H₂O destilada a las longitudes de onda 388 nm y 520 nm y posteriormente se neutralizó con NaOH para un pH final de 7.0. En la mayoría de los casos la concentración añadida de piocianina fue de 50 μ M, con excepción de los experimentos de las competencias entre PA14K y 10% de Δ lasR Δ rhIR donde se añadió un volumen de 500 y 1000 μ L del stock con una concentración aproximada de 5-10 μ M. Se ocupó esta concentración (50 μ M) porque fue un aproximado de la concentración intermedia obtenida en un cultivo puro de PA14K en caseína 0.5% (Figura 9).

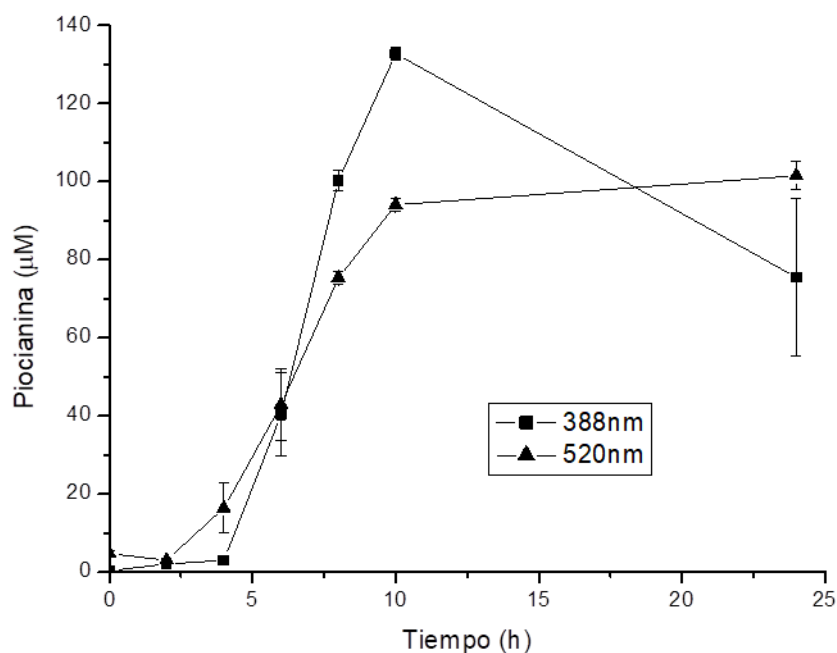


Figura 9 Producción de pocianina obtenida de un cultivo de PA14K en medio de caseína incubado por 24 h a 37°C y 200 rpm, utilizando los coeficientes de extinción molar 0.013µM-1cm-1 (388 nm) y 0.00246 µM-1cm-1 (520 nm) (Promedio ± error típico, n=3-6).

7.3.3. Concentración de oxígeno

La presencia de oxígeno representaba otro factor importante en la realización de este proyecto debido a su interacción con la pocianina producida. Con base en esto se realizaron experimentos en aerobiosis y también en anaerobiosis. *P. aeruginosa* cuenta con los genes necesarios para la obtención de energía en ausencia de oxígeno, mediante el proceso de desnitrificación. Este proceso se inicia con la detección de poco oxígeno por los centros Fe-S de Anr (regulador transcripcional) que aumenta la transcripción *narK/G* para una nitrato reductasa que reduce el nitrato (NO₃) a nitrito (NO₂), *nirS* para una nitrito reductasa que reduce el nitrito (NO₂) a óxido nítrico (NO), *norCB* para una óxido nítrico reductasa que reduce el óxido nítrico (NO) a óxido nitroso (N₂O) y finalmente *nosZ* para una óxido nitroso reductasa que reduce el óxido nitroso (N₂O) a nitrógeno molecular (N₂) (Figura10) (Sun Yoon et al., 2002; Schreiber et al., 2007).

Para la realización de estos experimento se utilizó una cámara de anaerobiosis que contenía 85% N₂, 5% CO₂ y 10% H₂ (V/V) (Forma Anaerobic System, Thermo Scientific, Japón) y al medio de cultivo se le agregó una concentración de 40 mM KNO₃ (Filiatrault et al., 2006).

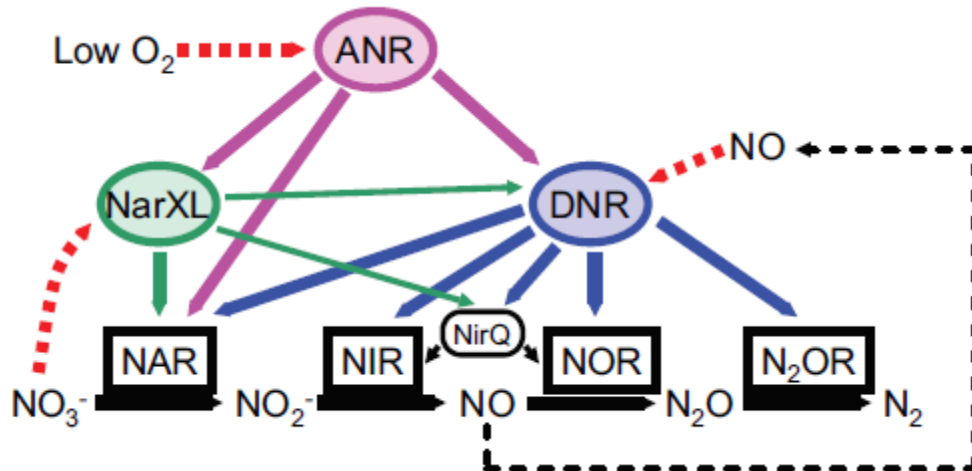


Figura 10 Modelo esquemático de la cadena regulatoria que controla los genes desnitificantes en *P. aeruginosa* (Arai, 2011).

7.4. Parámetros determinados

7.4.1. Crecimiento celular y proporciones

El crecimiento celular se puede medir con diferentes técnicas y se utiliza para evaluar la duplicación celular a través del tiempo. En este trabajo se midió de forma espectrofotométrica (densidad óptica a 600 nm) y mediante el conteo de células viables (unidades formadoras de colonia). Para la obtención de densidad óptica se tomaron muestras de forma periódica de los cultivos y se analizaron en un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu y VelaQuin, UV/VIS) a 600 nm. En el caso del conteo de células viables se obtuvo una muestra en esterilidad a la cual se le realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril (0.9% NaCl) y se inocularon en placas de LB que posteriormente incubando las placas a 37°C por 24 a 48 h.

La obtención de las proporciones se realizó con dos técnicas:

- Estriado directo:

Se tomó del cultivo una asada en esterilidad y se estrió en una caja Petri con medio LB que se incubó a 37°C por 24 h para la obtención de colonias aisladas de donde posteriormente se tomaron colonias al azar (entre 25-50) para su inoculación en placas de leche, de esta manera se pudieron diferenciar los individuos mediante su apariencia y la formación del halo de hidrólisis de caseína generado por las exoproteasas producidas, tomando en cuenta que cada colonia provenía de un individuo diferente (Wang et al., 2015 a). De este modo se pudieron obtener las proporciones de los individuos en cada condición.

- Unidades formadoras de colonias:

Se tomó en esterilidad una muestra del cultivo y se realizó una serie de diluciones con solución salina estéril (0.9% NaCl) y se inocularon en placas de leche, esta técnica ayudó para la mejor distinción de cepas como *E. coli DH5α* y *S. aureus*, debido a la distancia entre las colonias y la disminución de los efectos por la presencia de *P. aeruginosa*. Utilizando esta técnica también se pudieron obtener las proporciones de los individuos en cada condición (Figuras 21 y 45).

7.4.2. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son aquellos productos (toxinas y enzimas) cuya síntesis se estimula a partir de la activación de los sistemas de *quorum sensing*. Estos factores en muchas ocasiones generan ventajas sobre otros individuos y les confieren una resistencia mayor a condiciones de estrés. En el caso de nuestro modelo de estudio, *P. aeruginosa* cuenta con al menos tres sistemas de *quorum sensing* (Las, Rhl y Pqs) y cada uno estimula la síntesis de diversos factores de virulencia. A continuación, se enlistan los factores de virulencia y sus protocolos de detección que se utilizaron en este proyecto.

7.4.2.1. Elastasa:

Para su determinación se empleó una técnica colorimétrica, donde la elastina (sustrato) está asociada al colorante rojo congo, dicha interacción se ve interrumpida por la acción enzimática de la elastasa, degradando el sustrato y liberando el colorante, el cual es soluble en medio acuoso, permitiendo de esta forma su determinación espectrofotométrica a una longitud de onda de 495 nm (Naughton et al., 1969). Inicialmente la reacción se llevaba a cabo en una dilución 1:10 con el sobrenadante del cultivo sin células y el amortiguador de elastasa (100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ a un pH de 7.5) respectivamente y aproximadamente 5 mg de Elastina-Rojo congo (E0502-5G, Sigma-Aldrich) a un volumen final de 1 ml, incubándola por 3 h a 37°C con agitación constante de 200 rpm (Bjorn et al., 1979). Este método fue modificado para su optimización y en este nuevo protocolo se hizo una dilución de la muestra en el amortiguador de elastasa (1:100), y añadiendo exactamente 5 mg de Elastina-Rojo congo (E0502-5G, Sigma-Aldrich) a un volumen final de 1 ml, se incubó a 37°C por 2 h a 200 rpm. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min (Spectrafuge 16M, Labnet) y el sobrenadante se midió a 495 nm en un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu y VelaQuin, UV/VIS).

7.4.2.2. Proteasa Alcalina:

La presencia de la proteasa alcalina se cuantificó mediante una reacción colorimétrica, donde el colágeno (sustrato) estaba unido covalentemente con el colorante azul brillante (Remazol Brilliant Blue) que por acción de la enzima al degradar el colágeno se liberó y esto pudo ser cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm (Rinderknecht et al., 1968). Inicialmente la reacción se llevaba a cabo en una dilución (125 μ l: 1000 μ l) de sobrenadante del cultivo sin células con amortiguador de proteasa (100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ a un pH de 8.0) y aproximadamente 10 mg de Hide-Remazol Brilliant Blue R (H6268-5G, Sigma-Aldrich) a un volumen final de 1 ml, incubándola por 1 h a 37°C con agitación constante de 200 rpm. Este método también fue modificado para su optimización y en este nuevo protocolo se hizo una previa dilución de la muestra en el amortiguador de proteasa (1:10), de esta dilución se hizo otra dilución de 25:1000 con amortiguador de proteasa y con exactamente 2.5 mg de Hide-Remazol Brilliant Blue R (H6268-5G, Sigma-Aldrich) a un volumen final de 1 ml, se incubaron a 37°C por 35 min a 200 rpm. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min y el sobrenadante se midió a 595 nm en un espectrofotómetro.

7.4.2.3. Píocianina:

La determinación de este factor de virulencia fue con base en su coloración y para su extracción se utilizaron 800 μ l de muestra (sobrenadante sin células) para la extracción con cloroformo (420 μ l), se agitó en el vortex por 2 min y después se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. La solución se separó en dos fases y de la fase orgánica se tomaron 300 μ l para otra extracción con 800 μ l de HCl 0.2 N y al igual que en la extracción previa se agitó en vortex por 2 min, después se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Para su determinación se tomaron 650 μ l de la fase acuosa y se hizo una dilución 1:2 con agua bidestilada, esta solución se midió a 388 nm y a 520 nm.

Previamente a este proyecto en el laboratorio se realizó una curva de calibración (Figura 11) utilizando píocianina (P0046-5MG) y se midió a 388 nm. Mediante una regresión lineal se calculó el coeficiente de extinción molar de la píocianina a 388 nm que fue de 0.0139 μ M⁻¹ml⁻¹, este dato fue uno de los que se ocupó para calcular la concentración de la píocianina presente en todos los experimentos realizados.

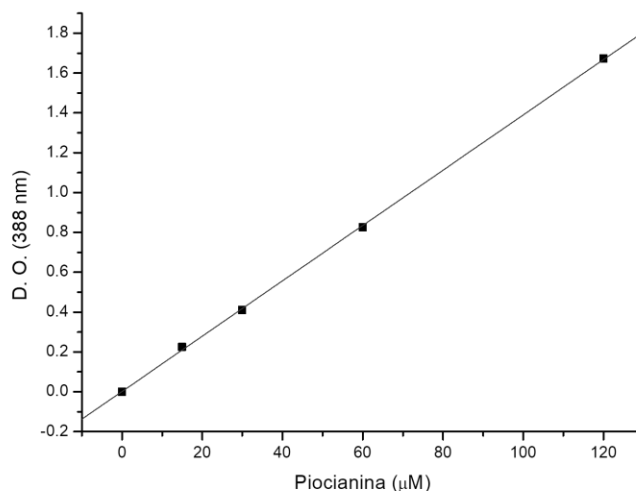


Figura 11 Curva de calibración de Piocianina a 388 nm.

Regresión Lineal			
Y = A + B * X			
Parámetro		Valor	Error
A		0.00185	0.0077
B		0.01388	1.24529*10 ⁻⁴
R	SD	N	P
0.99988	0.01181	5	<0.0001

Tabla 1 Datos de regresión lineal de la curva de calibración de Piocianina a 388nm.

También en investigaciones publicadas se encuentran registrados otros valores del coeficiente de extinción molar para la piocianina en una solución de 0.1 M HCl medido a una longitud de onda de 520 nm como 2.46 mM⁻¹ cm⁻¹ (Reszka et al., 2004), 17.072 μg/ ml (Alayande et al., 2018) y 12.8 mg/l (Lai et al., 2018). Se utilizó, además del valor obtenido en el laboratorio, el valor de extinción molar de Reszka para calcular la concentración de piocianina en los experimentos de este proyecto, ya que se sabe que a esta longitud de onda (520 nm) la detección de piocianina es característica, mientras que a 388 nm se pueden encontrar interferencias con las otras fenazinas producidas por *P. aeruginosa*.

7.4.3. Extracción de DNA

La extracción de DNA se hizo a partir de precultivos con 12 a 16 h de incubación a 37°C y agitación a 200 rpm en medio LB. De este cultivo se tomaron de 1.5 a 2 ml y se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana o *pellet* con 800 μl de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 1% SDS), se homogenizó vigorosamente por 2 min en el vortex. A este se le agregaron 500 μl de acetato de sodio 3 M. Todo esto se mezcló suavemente invirtiendo el tubo para

después incubarse en hielo por 10 min. Después se adicionaron 500 µl de una solución 24:1 de cloroformo/ alcohol isoamílico y se mezcló con vortex por 2 min. Se centrifugó por 5 min a 10000 rpm y se transfirió la fase acuosa a otro tubo, donde se agregaron de nuevo 500 µl de la solución cloroformo/ alcohol isoamílico, se centrifugó y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Después se agregaron 750 µl de etanol absoluto y se mezclaron invirtiendo suavemente el tubo hasta que el DNA se precipitó. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se decantó el líquido dejando la pastilla (DNA) en los tubos, a la cual se le hizo un lavado con 1 ml con etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 10000 rpm por 10 min. El DNA obtenido se dejó secando aproximadamente 2 a 3 h a temperatura ambiente. Cuando se secó por completo se adicionaron 300 µl de agua destilada estéril para su almacenamiento (Sambrook et al., 1989).

7.4.4. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó en este proyecto para comprobar la identidad de las cepas y por lo tanto, la cuantificación de las proporciones cuando se realizaron competencias entre las cepas PA14K WT, $K\Delta phzM$ y la doble mutante $\Delta lasR \Delta rhIR$, también se ocupó para la identificación de las cepas de *Acinetobacter baumannii*, ATCC 17978 y $\Delta abal$.

Primer/ cebador	Descripción	Producto	Referencia o fuente
<i>lasR</i>	<i>Forward</i> 5'-ATGGCCTTGGTTGACGGT-3'	706pb	López Jácome, et al 2019 En proceso
	<i>Reverse</i> 5'-GACCCAAATTAACGGCCA-3'		
<i>rhIR</i>	<i>Forward</i> 5'-ATGAGGAATGACGGAGGC-3'	675pb	López Jácome, et al 2019 En proceso
	<i>Reverse</i> 5'-CGCGTCGAACTTCTTCTG-3'		
<i>phzM</i>	<i>Forward</i> 5'-CTGCTGCGCGTAATTTGATA-3'	234pb	Este estudio
	<i>Reverse</i> 5'-TGGTGGGGGTATTAGCGTAG-3'		
<i>abal</i>	<i>Forward</i> 5'-CCAATATCATTGGTTGTGCC-3'	255pb	Este estudio
	<i>Reverse</i> 5'-TCGTAATGAGTTGTTTTGCG-3'		
<i>pbpC</i>	<i>Forward</i> 5'-TTTGACTGGGATGGTATTTCG-3'	419pb	Este estudio
	<i>Reverse</i> 5'-GGAATCTGGGTGCTATTCAT-3'		

Tabla 2 Primers o cebadores utilizados para realizar PCR.

Los primers o cebadores que se utilizaron fueron para los genes *lasR*, *rhIR* y *phzM* para *P. aeruginosa* y para *A. baumannii* fueron *abal* y *pdpC*; las secuencias de los dos pares ocupados (*Forward*= hacia adelante y *Reverse*= reverso) para cada gen se encuentran enlistados en la Tabla 2.

Para realizar la PCR se utilizó el DNA extraído con la metodología anteriormente descrita, así como los primers o cebadores: forward y reverse, amortiguador 10X, 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTP's, H₂O bidestilada estéril y la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*, Vivantis) para un volumen final de 40 µl; las condiciones que se utilizaron para estas amplificaciones fueron: 95°C por 1 min, 3 ciclos de 95°C por 1 min - 50°C por 45 s - 72°C por 2 min, 27 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturalización) - 52°C por 45 s (alineación) - 72°C por 2 min y 72°C por 10 min (extensión) y el equipo que se utilizó fue un Termociclador digital de Axygen. Los productos se almacenaron a 4°C.

La separación de los productos de la PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa 1% (m/v), el cual se sometió a 110 V por 55 min (Enduro 300V, Labnet) en una cámara de electroforesis con amortiguador TBE (1.1 M Tris, 900 mM borato y 25 mM EDTA a pH 8.0), utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb (TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), para después teñirse con bromuro de etidio (0.5 µg/ ml) por 10 a 15 min y revelarse en una lámpara de UV (Trans Lum Solo, Biotop) (Filloux et al., 2014).

7.5. Método de modificación de la cepa PA14K

7.5.1. Transducción

La transducción es el proceso por el cual se transfiere DNA de una bacteria a otra mediante una infección por bacteriófagos. Esto se debe a que el DNA del fago es reemplazado total o parcialmente con DNA de la bacteria donadora y transferido a bacterias receptoras. En el caso de la transducción especializada los fragmentos de DNA de la bacteria donadora en los fagos son pequeñas y específicas, por lo que se puede elegir el segmento o gen que se quiere transferir. Esta transducción se lleva a cabo con fagos temperados, lo que promueve una mejor transferencia de DNA al no provocar la lisis celular en las bacterias receptoras. Una vez transferido el fragmento de DNA por recombinación homóloga, el profago es escindido dejando el fragmento en el DNA bacteriano en la célula receptora (Filloux et al., 2014).

El bacteriófago utilizado en este proyecto fue DMS3, un fago temperado utilizado para la transducción de *P. aeruginosa* (Budzik et al., 2004). Primero, se propagó el fago, se mezclaron 100µl de cultivo (PA14) y 100µl de un stock del fago DMS3 en 3 ml de LB 0.8% agar atemperado a 45-50°C y se depositó sobre una placa de LB incubándose a 37°C de 12 a 14 h, esto para promover la infección y la reproducción del bacteriófago. Después de este tiempo sobre la placa se vertieron 3 ml de TMN (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄ y 150 mM NaCl a pH 7.4; o LB adicionado con 10 mM CaCl₂) para hidratar el agar suave (0.8%) y se raspó para desprenderlo de la placa. Se recuperó el agar suave y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min manteniendo el sobrenadante, al que se le agregaron 300 µl de

cloroformo para eliminar las células que pudieran haber quedado en la solución de fago. Segundo, se determinó el título del fago al que se iba a realizar la transducción. De un precultivo de la cepa donadora ($\Delta phzM$) se tomaron 100 μ l y se añadieron a 3 ml de LB 0.8% agar que se vertieron en una placa de LB, esta se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Simultáneamente del stock de fago obtenido anteriormente se hicieron diluciones seriadas (hasta 10^{-9}) en TMN. A la placa de LB inoculada se le agregó 5 μ l de cada dilución y se incubó a 37°C de 12 a 14 h. Las diluciones en las que se observó una cantidad aceptables de unidades formadoras de placas (una dilución antes de ser incontables), fueron 10^{-8} y 10^{-9} , por lo que con estas diluciones se llevó a cabo la transducción. Finalmente se tomaron 500 μ l de un precultivo de cepa receptora (PA14K), 500 μ l de la dilución de fago correspondiente, se incubaron por 20 min a 37°C para permitir la adsorción del fago y posterior infección, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 3 min y se agrega 1 ml de TMN, esto se realizó por duplicado. Después se tomaron 800 μ l, se centrifugaron a 10000 rpm por 3 min y el pellet se resuspendió en 200 μ l de TMN, a esta se le agregó 200 μ l de gentamicina (15 μ g/ml) y se vació en placas de LB que se incubaron a 37°C durante 12 a 14 h. Las células presentes en placa fueron las células mutantes ($K\Delta phzM$).

7.6. Análisis estadístico

El programa de análisis estadístico que se utilizó para realizar estos análisis fue IBM SPSS Statistics 25. Los estándares de significancia estadística de cada prueba se muestran en la Tabla 3. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

Tipo de prueba	Análisis	Significancia
Prueba de normalidad	Shapiro-Wilk	p>0.05
Prueba de homogeneidad de varianzas	Levene	p>0.05
Frecuencias	X ² Pearson (chi cuadrada)	p<0.05
Prueba paramétrica	T-student	p<0.05
Pruebas no paramétricas	Kruskal-Wallis (global)	p<0.05
	Mann-Whitney (pares)	p<0.05

Tabla 3 Valores de significancia de los análisis estadísticos realizados.

Previo al análisis de todos los datos se les aplicaron pruebas para comprobar su normalidad y homogeneidad de varianzas. Si estos supuestos se cumplían se continuó con una prueba paramétrica ANOVA. En caso de que no se cumplieran al menos uno de los supuestos anteriores se procedió a realizar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Si los resultados de la prueba mostraban que era significativa se hicieron pruebas pareadas de U de Mann-Whitney para poder identificar los pares que eran significativamente diferentes (Townend, 2002; Field, 2009).

Para los datos de frecuencia se realizaron análisis de χ^2 de Pearson para ver si existían diferencias significativas entre estos datos (Field, 2009).

7.7. Esquemas de las metodologías

A continuación se muestra de manera esquemática las metodologías que se llevaron a cabo para la realización de las competencias entre la cepa PA14K WT y los posibles *cheaters* ($\Delta lasR \Delta rhIR$, *E. coli* DH5 α , *S. aureus*) (Figura 12), las competencias entre la cepa $K\Delta phzM$ y la cepa doble mutante $\Delta lasR \Delta rhIR$ (Figura 13), las competencias entre la cepa $K\Delta phzM$ y la cepa $\Delta lasR \Delta rhIR$ adicionadas con piocianina (Figura 14), las competencias entre PA14K WT y la cepa $\Delta lasR \Delta rhIR$ en condiciones de anaerobiosis (Figura 15), la determinación de mutantes sin producción de proteasa que surgieron a partir de un cultivo inicial de PA14K WT o $K\Delta phzM$ (Figura 16) y por último la evaluación del efecto de la piocianina sobre competencias entre *A. baumannii* ATCC 17978 y $\Delta abal$ (Figura 17).

Figura 12: Competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ o *E. coli* DH5 α o *S. aureus*. Se inició el cultivo con una D.O. de 0.05 en total a partir de precultivos en LB, es decir que en las competencias de 90% se inocularon 0.045 (D.O.) de $\Delta lasR \Delta rhIR$ o *E. coli* DH5 α o *S. aureus* y 0.005 de PA14K, así mismo con las competencias de 50% y 10%. El medio de cultivo utilizado fue caseína 0.5%. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C y 200 rpm. A estos cultivos se les midió el crecimiento a lo largo del tiempo expresado en una curva de crecimiento, también se les determinaron los factores de virulencia: elastasa, proteasa alcalina y piocianina. Finalmente se cuantificaron las proporciones de cada población mediante la incubación de colonias aisladas en placas de LB-leche para observar el halo de hidrólisis de la caseína. En algunos casos también se determinaron las poblaciones mediante la amplificación de los genes: *lasR*, *rhIR* y *phzM*.

Figura 13: Competencias entre $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$. Se siguió el mismo procedimiento que en las competencias anteriores y se les determinaron los mismos parámetros (crecimiento, factores de virulencia y proporciones)

Figura 14: Competencias entre $K\Delta phzM$ (90%) y $\Delta lasR \Delta rhIR$ (10%). Se inició el cultivo con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ y a la 4ta hora de incubación se le agregó 500 μ l de H₂O, 500 μ l ó 1000 μ l del stock de piocianina. A estos cultivos se les midió el crecimiento a lo largo del tiempo y las proporciones de cada población.

Figura 15: Competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis. A partir de precultivos en LB adicionado con KNO₃ en anaerobiosis, se iniciaron los cultivos con las proporciones indicadas (10, 50 y 90% de la cepa $\Delta lasR \Delta rhIR$) en medio de caseína adicionada con KNO₃ en anaerobiosis. Se les determinó el crecimiento y las proporciones a lo largo del tiempo.

Figura 16: Evaluación del surgimiento de mutantes espontáneos deficientes de proteasas a partir de cultivo puros. Se iniciaron cultivos duplicados con PA14K o $K\Delta phzM$ únicamente y a un cultivo de cada cepa se le añadió 50 μM de piocianina. Todos los cultivos fueron incubados en caseína por 24 h a 37°C y 200 rpm. Al final de este tiempo se les determinó el crecimiento y si habían surgido mutantes deficientes de proteasa mediante la incubación de colonias aisladas en placas de LB-leche. A partir de estos cultivos de caseína, se re-inocularon otros matraces en las mismas condiciones, es decir, si el cultivo anterior tenía 50 μM de piocianina se sembraba en un medio con 50 μM de piocianina otra vez. Al final de las 24 h de cultivo en las mismas condiciones, se determinaron el crecimiento y el surgimiento de mutantes del nuevo cultivo. Esta resiembra se repitió de mismo modo por 15 días.

Figura 17: Competencias entre *A. baumannii* WT y $\Delta abal$. A partir de precultivos en LB, se iniciaron las competencias en LB con 50% de cada cepa por duplicado y a uno de estos cultivos se le agregó 50 μM de piocianina. Al inicio y después de 20 min de incubación (37°C y 200 rpm), se determinaron las proporciones de cada población, en este caso mediante la amplificación de los genes *abal* y *pbpC*.

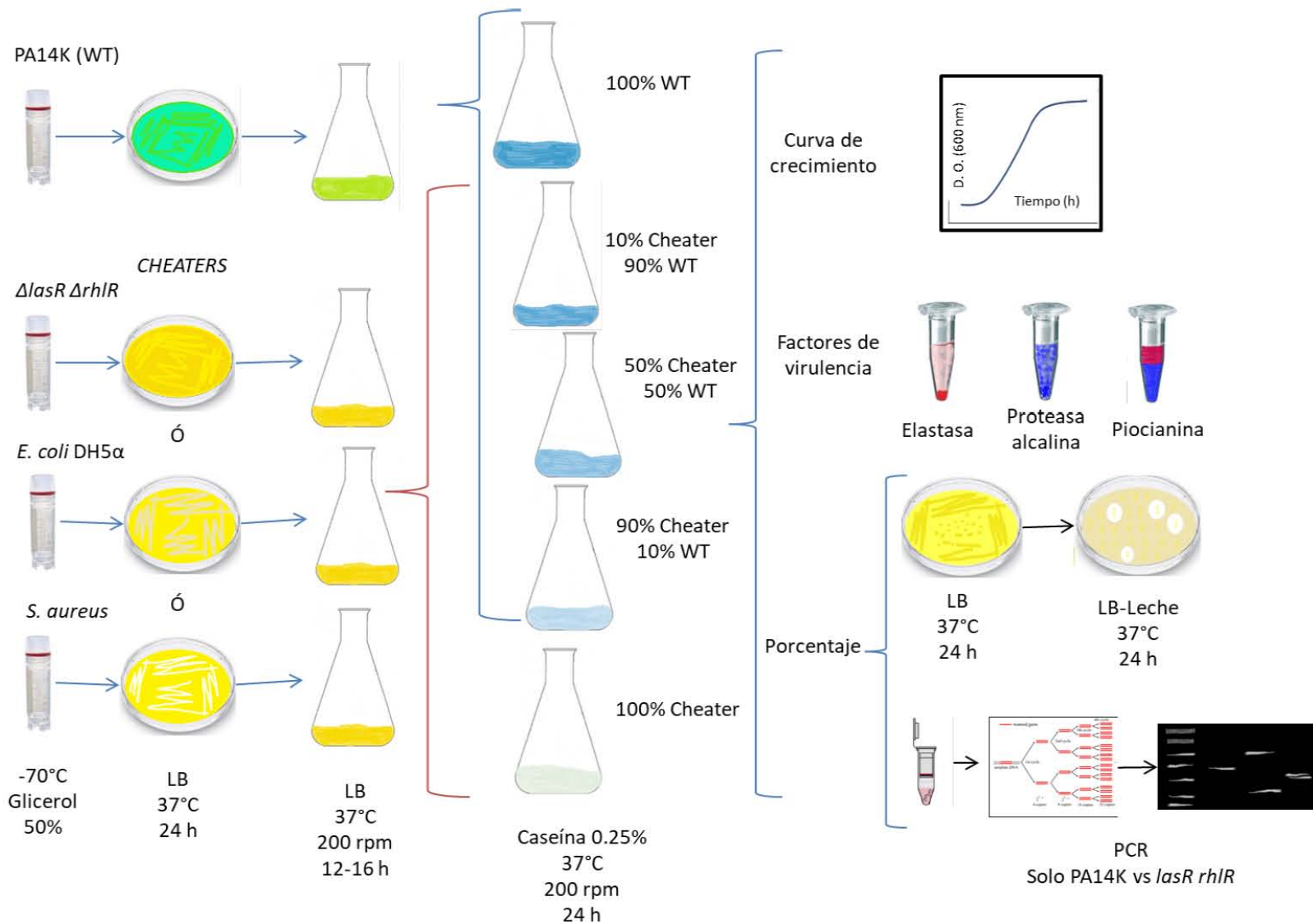


Figura 12 Esquema de la metodología seguida en competencias con PA14K y *ΔlasR ΔrhIR* o *E. coli* DH5α o *S. aureus*.

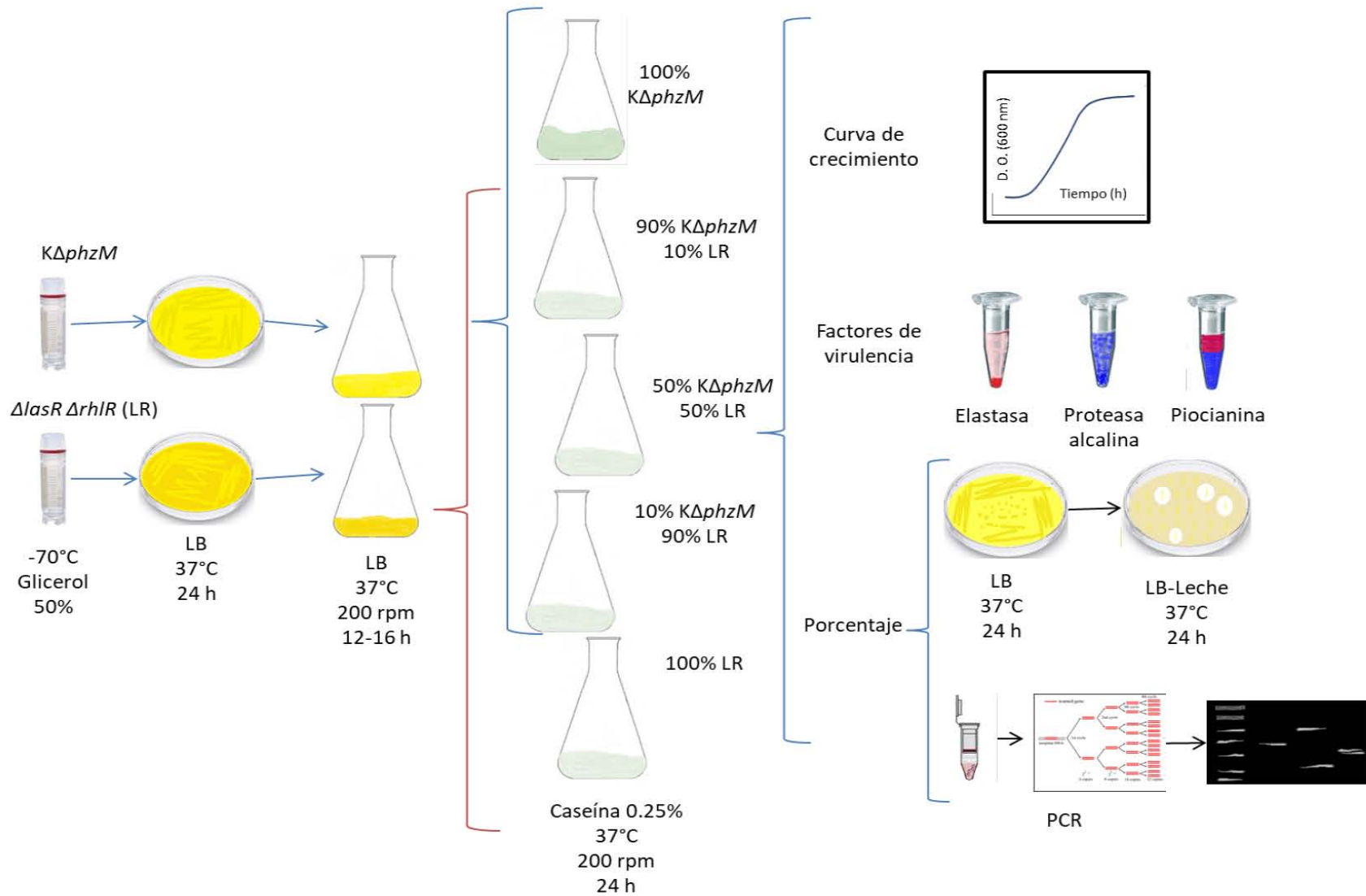


Figura 13 Esquema de la metodología seguida en competencias de *KΔphzM* y *ΔlasR ΔrhIR*.

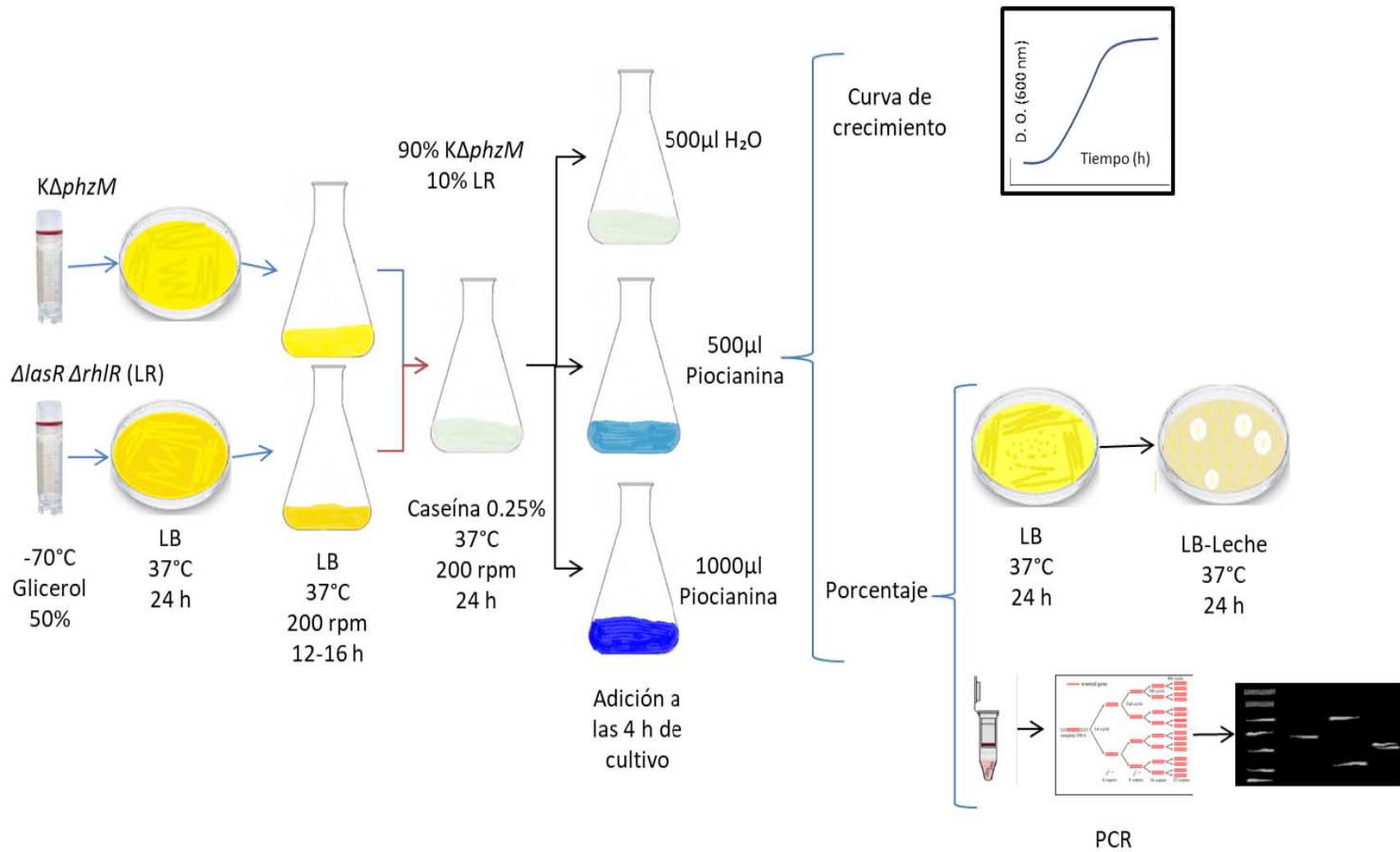


Figura 14 Esquema de la metodología seguida en competencias con 90% de *KΔphzM* y 10% de *ΔlasR ΔrhIR* con adición de piocianina.

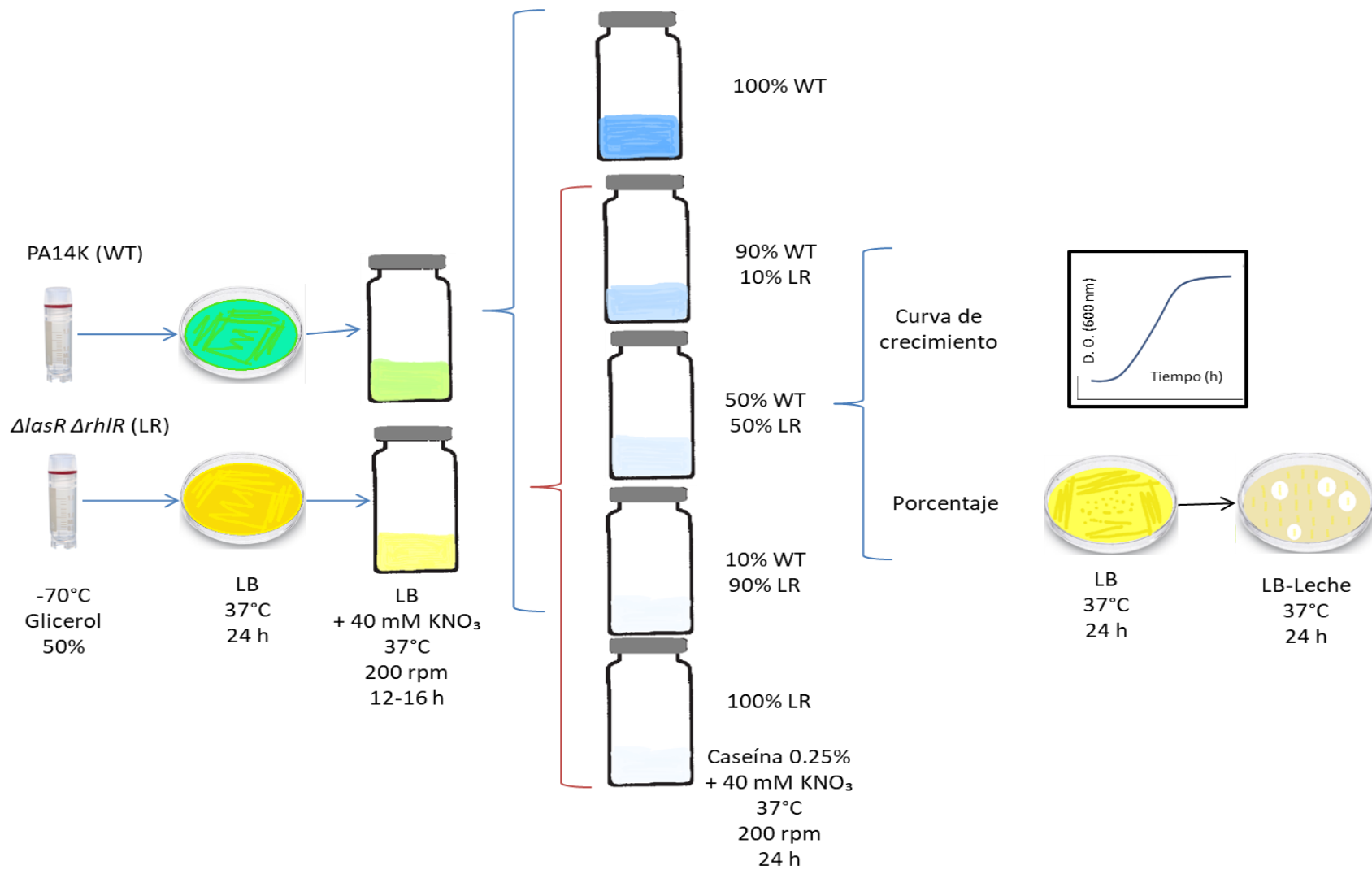


Figura 15 Esquema de la metodología seguida en competencias de PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis.

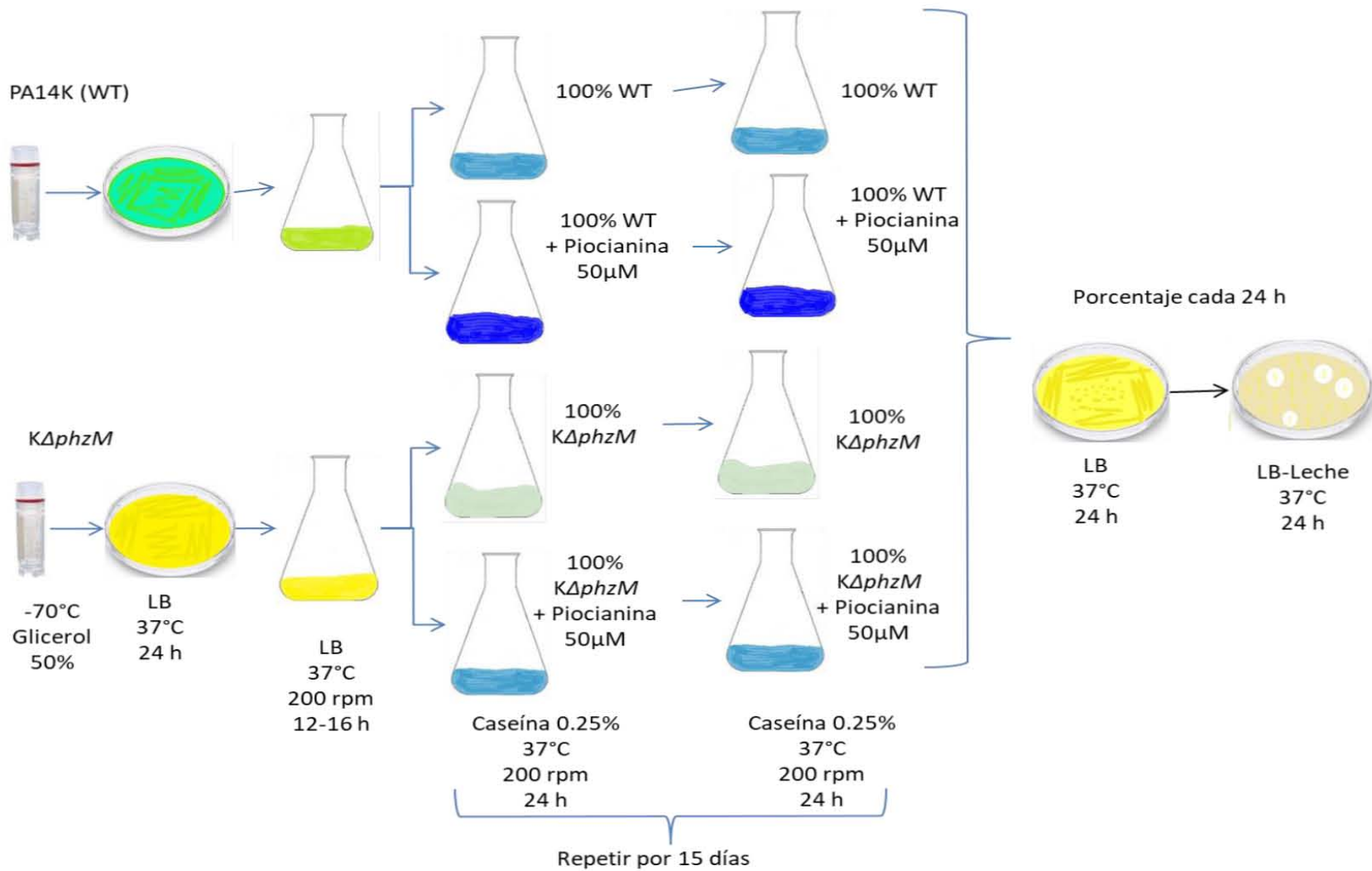


Figura 16 Esquema de la metodología seguida para evaluar el efecto de la piocianina en la aparición de mutantes espontáneos deficientes de proteasa en cultivos de *PA14K* (WT) y *KΔphzM*.

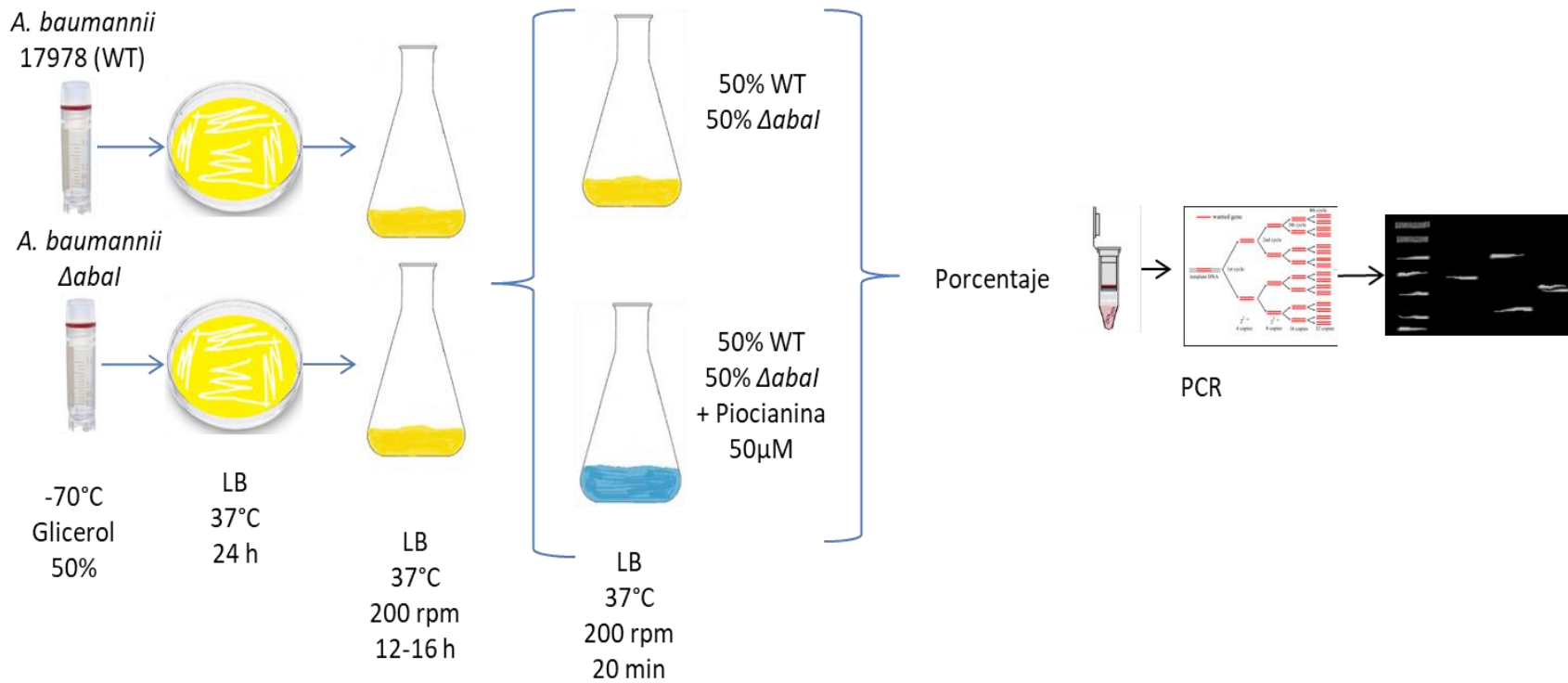


Figura 17 Esquema de la metodología seguida para evaluar el efecto de la píoocianina sobre células con o sin QS en competencias entre *A. baumannii* (WT) y $\Delta abal$.

8. RESULTADOS

8.1. Oportunismo de las células sin *quorum sensing* activo ($\Delta lasR \Delta rhIR$) en competencia con WT

Los primeros experimentos realizados en este proyecto fueron las curvas de crecimiento de las dos poblaciones de *P. aeruginosa* (PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$) y las competencias entre estas poblaciones iniciando con 10%, 50% y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en el medio de cultivo de caseína 0.5%. En la figura 18 se muestran estos resultados y como se puede observar la cepa WT (PA14K) tuvo el mejor crecimiento en este medio de cultivo al compararlo con las demás condiciones. También se observa que a medida que se disminuyó su porcentaje inicial en las competencias el crecimiento del cultivo también decreció, esto probablemente debido a la disminución de la concentración de las exoproteasas producidas por la cepa WT, que son necesarias para la degradación de la caseína en el medio y su posterior utilización como fuente de carbono. Así mismo, también se puede observar que el cultivo de la cepa $\Delta lasR \Delta rhIR$ no fue capaz de crecer en este medio debido a la ausencia de exoproteasas. A estos cultivos se les midieron los factores de virulencia (elastasa, proteasa alcalina y plicianina) a las 24 h, estos resultados se observan en la figura 19.

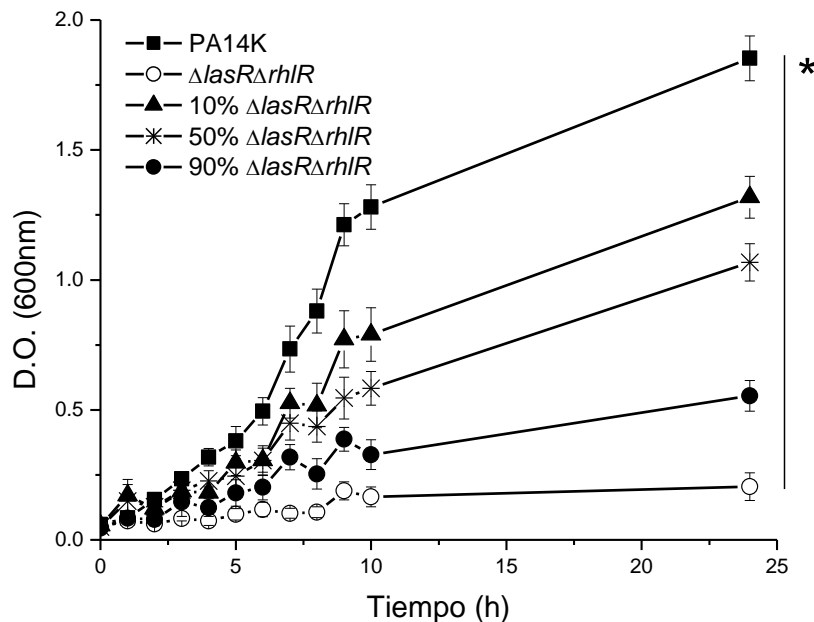


Figura 18 Curvas de crecimiento de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, en medio de caseína 0.5% incubado a 37 °C y 200 rpm por 24 h. (Promedio \pm error típico, n=21-33, * Mann-Whitney, p<0.05).

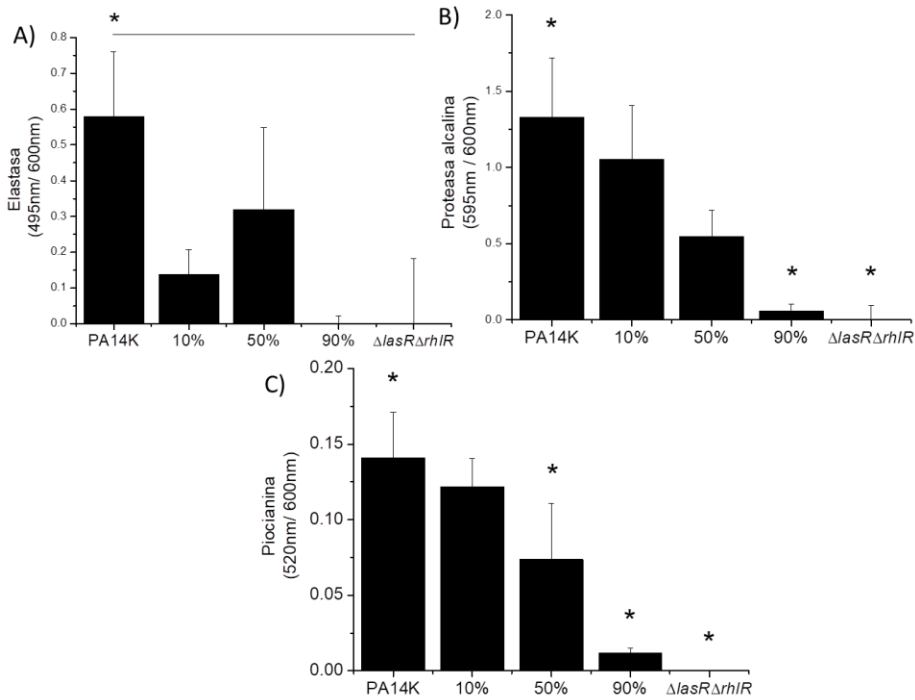


Figura 19 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de los cultivos de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, en medio de caseína 0.5% incubado a 37 °C y 200 rpm. (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=5-17, B) Proteasa alcalina n=12-33 y C) Pilocianina n=5-13; * Mann-Whitney, p<0.05).



Figura 20 Fotografía de los cultivos de las competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, en medio de caseína 0.5% incubado a 37 °C y 200 rpm a las 24 h.

En la figura 19 se muestran los valores normalizados (divididos entre la densidad óptica del cultivo a las 24 h) de elastasa, proteasa alcalina y pilocianina. En la figura 19A correspondiente a la elastasa, se puede observar que su producción no siguió un patrón claro, es decir, la producción de elastasa está dada por el gen

lasB, el cual es activado por el sistema de quórum Las, por lo tanto, la población mutante ($\Delta lasR \Delta rhIR$) es incapaz de producir este factor de virulencia ya que no cuenta con el receptor de señal que estimule su transcripción, por lo que su producción está limitada a la población WT. En este caso se esperaría haber observado que la concentración de elastasa disminuía proporcionalmente a la proporción de la población WT presente en el cultivo, pero se observó que en el experimento con 50% de proporción inicial de las dos cepas, tuvo una concentración mayor que el experimento con 10% inicial de $\Delta lasR \Delta rhIR$, esto sugiere que hubo una sobreproducción por parte de población WT en esta condición y podría significar un reflejo en el aumento en la activación de este sistema de quórum por la misma condición.

La proteasa alcalina por otra parte, es un bien público importante para el crecimiento en este medio de cultivo, ya que esta exoproteasa es la encargada de degradar la mayor cantidad de caseína para ocuparla como fuente de carbono y al igual que la elastasa es producida únicamente por la población WT. En la figura 19B se puede observar que la producción de este factor de virulencia presentó una relación con la proporción inicial de la población WT, es decir, cuanto mayor fue la proporción de WT inicial, mayor fue la concentración de proteasa alcalina en el medio, sin embargo, esta producción se midió a las 24 h del cultivo y hasta ese momento no se sabía si las proporciones de las células había cambiado a lo largo del tiempo.

Otro factor de virulencia que se midió en estos cultivos fue la piocianina. En la figura 19C, se puede observar que su producción también mostró un patrón similar a la producción de proteasa alcalina, es decir, a mayor proporción de células productoras (WT) mayor concentración de piocianina en el medio. A diferencia de la proteasa alcalina que es un bien público y un factor de virulencia activado por el sistema de quórum Las, la piocianina no tiene una función aparente que favorezca el crecimiento en este medio de cultivo y es regulado por los sistemas Rhl y Pqs, por lo cual su producción no tendría relación con la estimulación positiva que se observó con la elastasa y la proteasa. Con base en estos resultados decidimos estudiar más a fondo la razón de por qué la piocianina muestra una posible sobreproducción en estas condiciones.

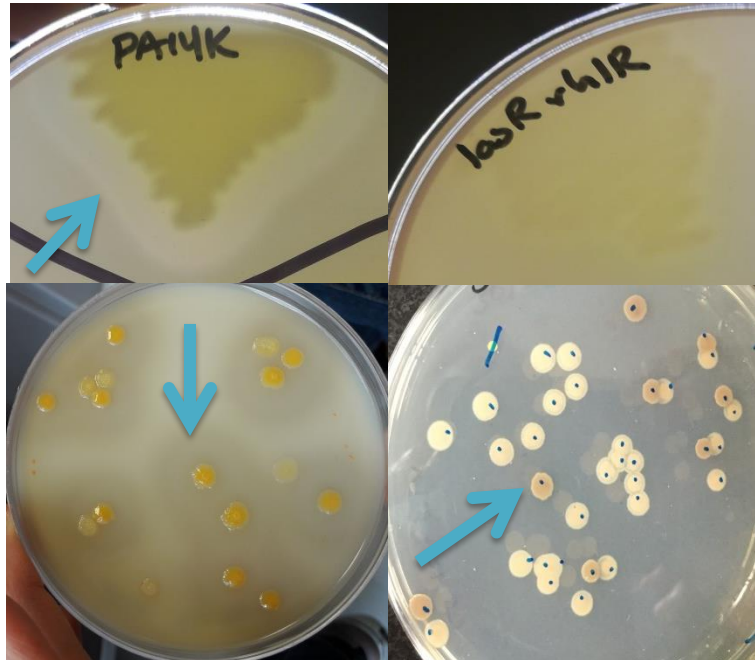


Figura 21 Apariencia de cepas PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en cajas con medio leche-LB y LB, flecha señala cepa PA14K con halo de hidrólisis de caseína, incubadas por 24 h a 37°C.

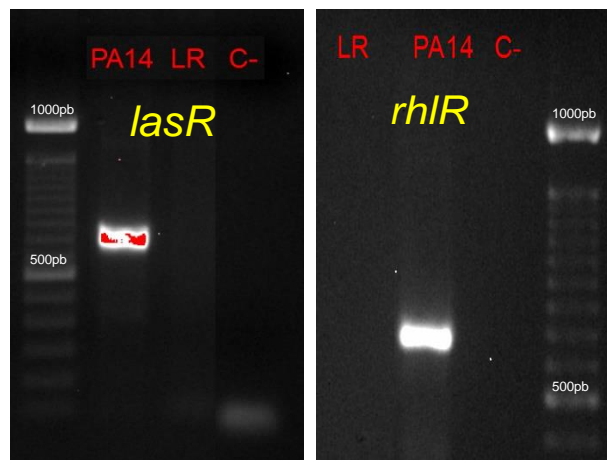


Figura 22 Electroforesis en gel de agarosa 1%, PCR de cepas PA14K (PA14) y $\Delta lasR \Delta rhIR$ (LR) con los genes *lasR* (706pb) y *rhIR* (675pb) para la determinación de las proporciones en las competencias entre estas cepas. Control negativo sin DNA (C-).

También en este primer experimento se cuantificaron periódicamente las proporciones de las poblaciones en las competencias, por lo que a lo largo del cultivo se tomaron muestras para determinarla. Este valor se obtuvo realizando dos técnicas: 1. Mediante cuantificación en placas de leche-LB y 2. Mediante la identificación de las cepas utilizando PCR. La técnica de cuantificación en placas de leche-LB se basó en la capacidad de las cepas para degradar la leche, es decir, la producción de exoproteasas por parte de las cepas WT y su nula capacidad de producción por parte de las cepas mutantes ($\Delta lasR \Delta rhIR$) (Figura 21). La técnica de identificación mediante PCR fue con base en la amplificación de los genes *lasR* y *rhIR*, ambos ausentes en la mutante

(Figura 22). En la figura 23 se puede observar el porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ a lo largo de las curvas de crecimiento en las tres competencias evaluadas (10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$).

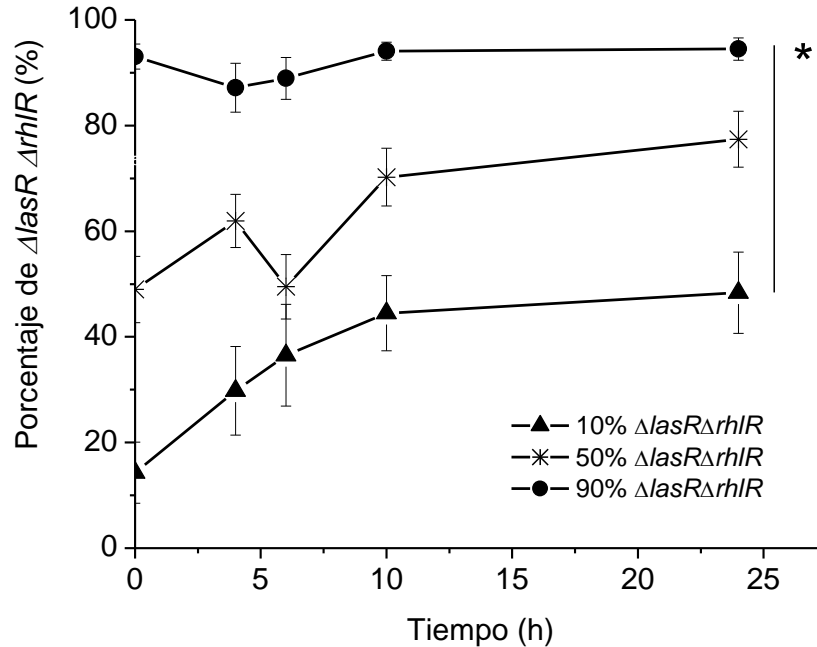


Figura 23 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en las competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, 10% n=12-21, 50% n=11-18 y 90% n=8-14; χ^2 p<0.001).

Se puede observar que solo en la condición con 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ inicial (Figura 23) se conservó este porcentaje casi todo el tiempo de cultivo, mientras que en las otras dos condiciones aumentó. La competencia iniciada con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, al final del cultivo tuvo un porcentaje de casi 50% (48.36), aumentando 5 veces su proporción inicial, en cambio la competencia iniciada con 50% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ terminó con un porcentaje de casi 80% (77.39), esto quiere decir que en estas dos condiciones la población mutante fue capaz de utilizar los productos de los bienes públicos de la población WT para su beneficio sin una aparente contribución al beneficio del cultivo (*cheating*). Con esto también se puede sugerir que en estos dos casos la producción de exoproteasas fue suficiente para sostener el crecimiento de las dos poblaciones, pero la población mutante fue la que se vio más beneficiada debido a su condición, ya que estas no tienen los genes activadores de la respuesta del quórum por lo que la energía obtenida se enfoca en su crecimiento y no en montar la respuesta de la activación del quórum.

Un detalle particular que se observa en la figura 23 es también que a partir de la hora 10 de cultivo no hubo un aumento en el porcentaje de mutantes en los

cultivos de 10 y 50% como se vio en las horas anteriores, por lo que se podría decir que se llega a un equilibrio o también que existe un posible control que está limitando que la proporción mutante aumente.

En estas competencias todas las distintas condiciones de crecimiento (densidad óptica) son significativamente diferentes a las 24 h, mientras que la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación no (Tabla 4). En el cultivo de células WT y la competencia de 10% estos dos parámetros son iguales, sin embargo, todas las demás condiciones son significativamente diferentes con respecto al cultivo WT y curiosamente los cultivos de 50 y 90% muestran una velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación iguales. Esta diferencia entre el crecimiento del cultivo y la igualdad en su velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación para el cultivo WT y la competencia de 10%, es posible que se deba a la distribución de los nutrientes y su utilización entre la población; es decir, en el cultivo WT todas las células son capaces de activar los sistemas de quórum, a la vez que ayudan a su detección por la producción de autoinductores y como resultado, todos contribuyen a la producción de exoproteasa obteniendo el beneficio mediante la captación de nutrientes para generar ese crecimiento, lo que representaría un equilibrio entre obtención de energía y su utilización. Mientras tanto, en el cultivo con 10% como sabemos ahora su población no se mantuvo en esta proporción a lo largo del cultivo sino que fue aumentando, esto significa que a partir de la 4ta hora como se observó en la figura 23, inició el aumento de oportunistas modificando el equilibrio, principalmente en la obtención de recursos, ya que estas células solo ocupan los nutrientes y probablemente no solo los necesarios para su crecimiento, ya que si la equidad entre los nutrientes utilizados y las células fuera la misma que en el cultivo WT, el crecimiento sería igual o incluso mayor. Esto probablemente también ocurrió en las demás condiciones pero ya que la proporción de WT fue menor y por lo tanto, la concentración de proteasas también y aunque el oportunismo se observó en estas condiciones fue menos sencillo percibir este fenómeno de la utilización de los nutrientes y la cantidad de células.

Cultivo/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
PA14K	$0.34 \pm 0.02^*$	$2.15 \pm 0.1^*$
10% $\Delta lasR \Delta rhIR$	0.32 ± 0.02	2.29 ± 0.16
50% $\Delta lasR \Delta rhIR$	$0.23 \pm 0.01^*$	$3.26 \pm 0.23^*$
90% $\Delta lasR \Delta rhIR$	$0.25 \pm 0.02^*$	$2.96 \pm 0.26^*$
$\Delta lasR \Delta rhIR$	$0.11 \pm 0.03^*$	$7.45 \pm 1.70^*$

Tabla 4 Parámetros determinados de las competencias entre las cepas PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ cultivadas en medio de caseína 0.5% por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=5-33; ^{*1-2}Mann-Whitney p < 0.05).

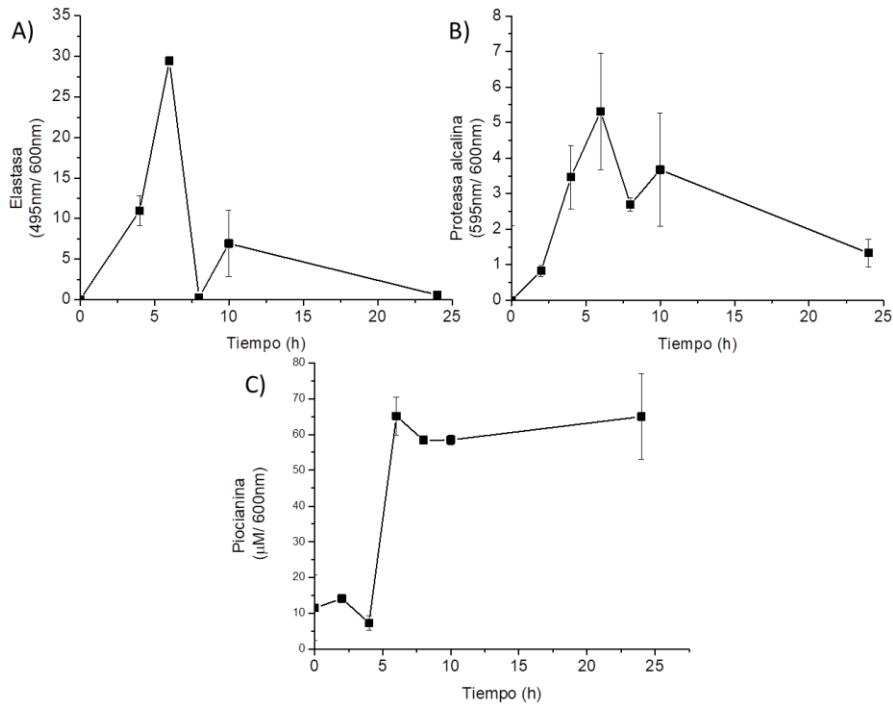


Figura 24 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento, determinados de los cultivos de PA14K en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio ± error típico, A) Elastasa n=3-17, B) Proteasa alcalina n=3-16 y C) Pilocianina n=3-6)

Como controles para este experimento se realizaron otros cultivos en caseína 0.5% de la cepa WT y se midieron los factores de virulencia a lo largo del tiempo de cultivo (Figura 24).

En la figura 24 se puede observar que la producción de elastasa (Figura 24A) tuvo su punto máximo de producción a las 6 horas del cultivo pero no se mantuvo constante, por lo que al final del cultivo no se observó casi actividad. En cuanto a la producción de proteasa alcalina (Figura 24B) también tuvo su pico de producción a las 6 horas pero a diferencia de la elastasa si mostró actividad hasta el final del cultivo, lo que sugiere es funcional desde su producción y durante todo el tiempo en que se midió la curva de crecimiento. Por último, la pilocianina (Figura 24C) también tuvo su pico de producción a las 6 horas de cultivo y se mantuvo casi constante por el resto del tiempo. Este factor de virulencia a diferencia de los otros dos es un pigmento, por lo que no tiene un tiempo límite de funcionamiento y el método que se empleó para su detección no depende de una reacción enzimática. Todos estos picos de producción coinciden con la fase exponencial del cultivo, sugiriendo que a esta hora en el cultivo se alcanzó el quórum suficiente para la activación de los genes regulados por este mecanismo.

La concentración de proteasa tiene un papel fundamental en estos experimentos ya que es el bien público que favorece el oportunismo. Su producción estimula el aumento de la población *cheater* en las competencias, es decir, en las curvas WT su producción empieza a las 2 h (Figura 24B) y aumenta a lo largo del tiempo,

mientras el incremento de la población *cheater* comienza al mismo tiempo (Figura 23). La producción de este factor también indica que a este tiempo hay suficiente concentración de autoinductores para la activación de los sistemas de quórum, en específico del sistema Las que es el responsable por la producción de proteasa.

Aparte de las curvas en caseína (Figura 25A), también se hicieron otros cultivos en el mismo medio pero con las diferentes condiciones que se probaron a lo largo del proyecto, es decir: agregando una proteasa externa (0.98 u/ ml, proteasa tipo XIV de *Streptomyces griseus*, P5147-1G, Sigma-Aldrich) y en un medio de casaminoácidos (Figura 25C) con el fin de observar el efecto de estas condiciones en cultivos puros de las cepas utilizadas. Los datos de la curva de crecimiento en caseína 0.5% adicionando 0.98 u/ ml de proteasa externa se puede observar en figura 25B. En esta figura se puede ver que la cepa doble mutante tuvo un crecimiento mayor que la WT, esto se debe a que la cepa mutante no tiene la activación de los sistemas de quórum Las y Rhl, por lo tanto, la energía adquirida es utilizada en su mayoría solo para el crecimiento mientras que la cepa WT, la cual sí cuenta con los sistemas de quórum funcionales, tiene que activar la respuesta a este estímulo y su energía está dividida entre el crecimiento y la transcripción y traducción de los genes activados por quórum. En esta figura y con base en los datos obtenidos también se puede observar que la cepa mutante fue capaz de utilizar los productos finales de una proteasa para la obtención de nutrientes, confirmando que pudo realizar el fenómeno de *cheating* en los experimentos de las competencias.

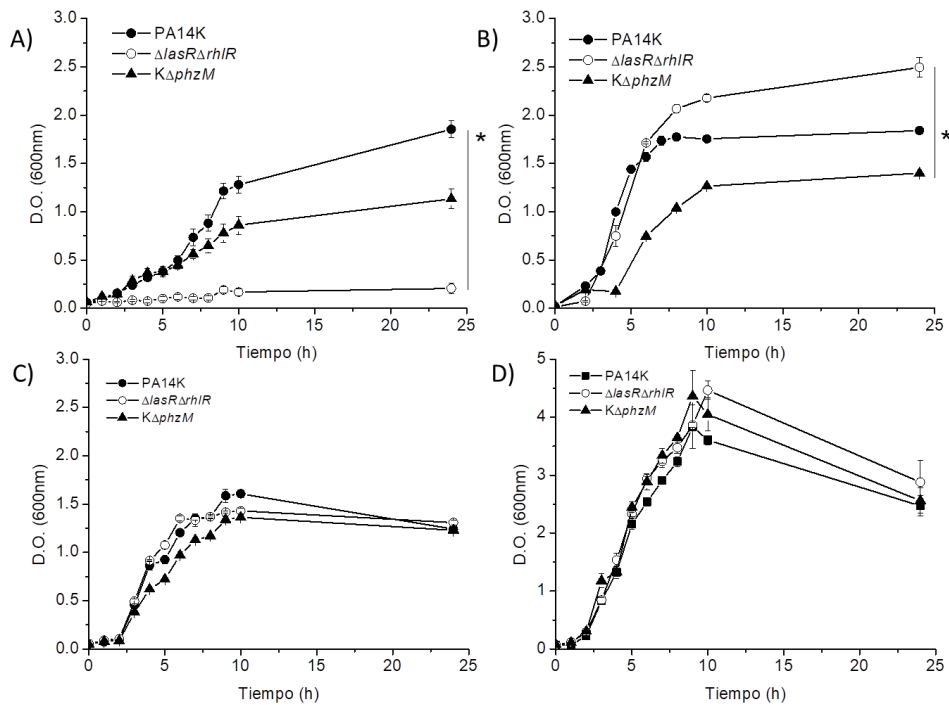


Figura 25 Curvas de crecimiento de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y $K\Delta phzM$ en las diferentes condiciones evaluadas. A) medio de caseína 0.5%, B) medio de caseína 0.5% adicionado de 0.98 u/ ml de

proteasa, C) medio de casaminoácidos, D) medio LB. Incubados a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, n=3-4; *Mann-Whitney $p < 0.05$)

Cepa/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)	Elastasa (495nm/ 600nm)	Proteasa alcalina (595nm/ 600nm)	Piociarina (520nm/ 600nm)
PA14K	0.34 \pm 0.02*	2.14 \pm 0.1*	0.58 \pm 0.18*	1.33 \pm 0.39*	0.14 \pm 0.03*
<i>KΔphzM</i>	0.30 \pm 0.02	2.35 \pm 0.16	1.34 \pm 0.36*	1.12 \pm 0.46	0.001 \pm 0.001*
<i>ΔlasR ΔrhIR</i>	0.11 \pm 0.02*	7.45 \pm 1.70*	0 \pm 0.18*	0 \pm 0.09*	0 \pm 0.01*

Tabla 5 Parámetros determinados de cultivos de las cepas PA14K, *K Δ phzM* y *Δ lasR Δ rhIR* cultivadas en medio de caseína 0.5% por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-32, *Mann-Whitney $p < 0.05$).

Medio de cultivo	Cepa	Parámetros				
		Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)	Elastasa (495nm/600nm)	Proteasa alcalina (595nm/600nm)	Piociarina (520nm/600nm)
Caseína + Proteasa	PA14K	0.87 \pm 0.02	0.8 \pm 0.02	1.82 \pm 0.11	1.33 \pm 0.1*	0.03 \pm 0.002*
	<i>KΔphzM</i>	0.79 \pm 0.03	0.87 \pm 0.03	5.57 \pm 0.36*	2.76 \pm 0.26	0 \pm 0.0005*
	<i>ΔlasR ΔrhIR</i>	0.89 \pm 0.02	0.78 \pm 0.02	0 \pm 0.04*	0.02 \pm 0.07*	0 \pm 0*
Casamino- Ácidos	PA14K	1.07 \pm 0.01* ¹	0.64 \pm 0.01* ¹	1.15 \pm 0.07*	0.86 \pm 0.22* ¹	0.02 \pm 0.01
	<i>KΔphzM</i>	0.98 \pm 0.01* ²	0.70 \pm 0.01* ²	2.17 \pm 0.06*	1.58 \pm 0.43* ²	0.007 \pm 0.006
	<i>ΔlasR ΔrhIR</i>	1.08 \pm 0.01* ^{1,2}	0.64 \pm 0.01* ^{1,2}	0 \pm 0.02*	0 \pm 0.04* ^{1,2}	0.01 \pm 0.01

Tabla 6 Parámetros determinados de cultivos de las cepas PA14K, *K Δ phzM* y *Δ lasR Δ rhIR* cultivadas en medio de caseína adicionada con 0.98u/ml de proteasa y medio de casaminoácidos por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-32; *^{1,2}Mann-Whitney $p < 0.05$).

El costo de la activación del quórum se comprobó de la misma manera que lo hicieron Diggle y colaboradores, haciendo crecer a las cepas utilizadas en un medio de cultivo donde no fuera necesaria la producción de los bienes públicos para crecer (Diggle et al., 2007), en este caso se ocupó un medio enriquecido como el medio LB, el mismo medio de caseína adicionado con proteasa y el medio de casaminoácidos donde los productos de la degradación de caseína se encontraban disponibles (Figura 25). En el medio de caseína adicionada con proteasa, se confirmó que la cepa doble mutante es capaz de utilizar los productos de proteasas para su crecimiento y también que es capaz de crecer aún más que las cepas WT (con o sin producción de piociarina (*K Δ phzM*)), evadiendo el costo de la activación del quórum. Mientras tanto, el crecimiento de la cepa WT sin piociarina, tiene una leve disminución en su crecimiento de la misma forma que se ve en el cultivo en caseína sin proteasa. Esta disminución en el crecimiento es probable que esté relacionada con la disminución en la producción de proteasa que presenta esta mutante (Tabla 5), sin embargo, en un medio de cultivo donde

están disponibles estos nutrientes como lo es el medio de casaminoácidos, el crecimiento de las tres cepas es exactamente el mismo, sugiriendo que el metabolismo es similar en todas ellas cuando los nutrientes están disponibles (Tabla 6).

8.2. Efecto de la piocianina sobre las células sin *quorum sensing* ($\Delta lasR \Delta rhIR$)

8.2.1. Ausencia de piocianina

Tomando en cuenta todo lo anterior y el hecho de que la piocianina es capaz de promover la generación de especies reactivas de oxígeno, se evaluó si esta tenía algún efecto en la población de células sin quórum, para lo cual se interrumpió el gen *phzM*, el cual es responsable de la síntesis de piocianina, esto mediante una transducción con ayuda del bacteriófago DMS3. En la figura 26 se pueden observar las curvas de crecimiento de los cultivos solos de $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ y de las competencias de 10, 50 y 90%.

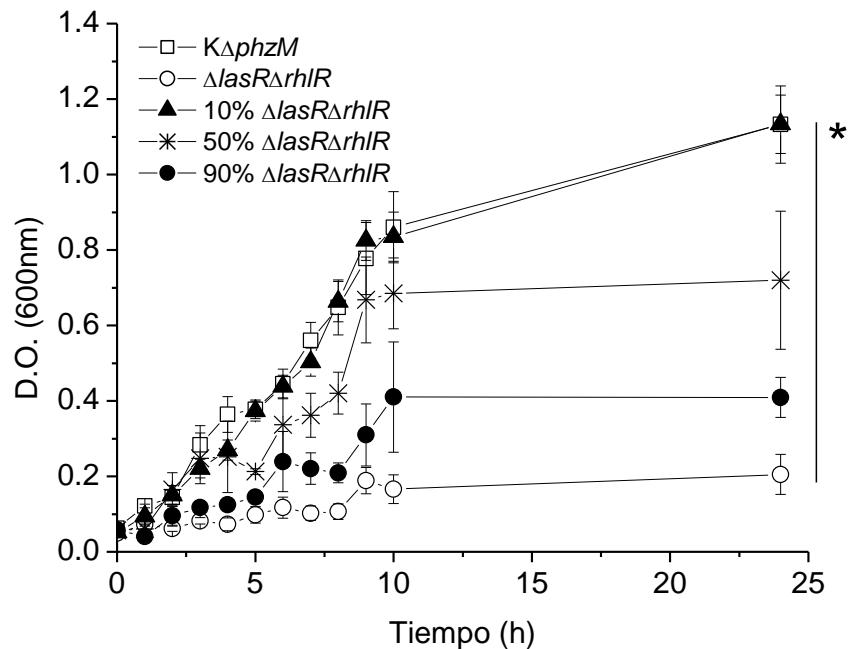


Figura 26 Curvas de crecimiento de $K\Delta phzM$, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).

En estas curvas de crecimiento se puede observar que el cultivo de $K\Delta phzM$ y el de 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ crecieron de forma muy similar, mientras que los de 50 y 90% se comportaron parecido a las competencias anteriores, es decir, que

disminuyó su crecimiento, mientras menos proporción inicial de cepa WT tuvieron, en este caso *KΔphzM*. Cabe mencionar que en todos los casos donde está presente *KΔphzM* hubo una leve disminución en el crecimiento del cultivo en comparación con los cultivos donde estaba PA14K (Figuras 18 y 26).

Los crecimientos del cultivo WT sin piocianina (*KΔphzM*) y la competencia de 10%, no muestran diferencias significativas, esto es similar a lo obtenido en las competencias con producción de piocianina; pero en este caso en los parámetros cinéticos (velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación), no presentan diferencias significativas (Tabla 7), esto puede sugerir que a diferencia de los cultivos con piocianina, en estos experimentos el crecimiento en los cultivos no se ve limitado y más específicamente el crecimiento de las mutantes. Por otro lado, como se mencionó anteriormente el crecimiento final sí es diferente entre los cultivos, a pesar de tener una velocidad de crecimiento similar, esto sugiere que en estas competencias ocurre lo mismo que en las anteriores; los nutrientes no son utilizados equitativamente ya que en estas competencias las células mutantes alcanzan una mayor frecuencia que la registrada con la presencia de piocianina, siendo así esta inequidad más evidente.

Cultivo/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
<i>KΔphzM</i>	$0.30 \pm 0.02^*$	$2.35 \pm 0.16^*$
10% <i>ΔlasR ΔrhIR</i>	$0.26 \pm 0.02^*$	$5.22 \pm 1.62^*$
50% <i>ΔlasR ΔrhIR</i>	0.21 ± 0.03	3.6 ± 0.58
90% <i>ΔlasR ΔrhIR</i>	0.21 ± 0.06	4.44 ± 1
<i>ΔlasR ΔrhIR</i>	$0.11 \pm 0.03^*$	$7.45 \pm 1.70^*$

Tabla 7 Parámetros determinados de las competencias entre las cepas *KΔphzM* y *ΔlasR ΔrhIR* cultivadas en medio de caseína por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney $p < 0.05$).

Al igual que en las competencias anteriores se midieron los factores de virulencia a las 24 h y las proporciones de la población *ΔlasR ΔrhIR* a lo largo de todo el tiempo de cultivo, estos resultados se muestran en las figuras 27 y 28 respectivamente.

En la figura 27A indica la presencia del factor de virulencia elastasa medido a las 24 h, se puede distinguir claramente que en las condiciones de 10 y 50% tuvo una mayor concentración a este tiempo que el cultivo con la cepa sin piocianina, probablemente por una sobreproducción, pero como ya se mencionó anteriormente este factor de virulencia parece ser poco relevante para el crecimiento en este medio de cultivo, sin embargo, puede ser tomado como un control de la activación del sistema de quórum Las, que en estos dos casos sugiere haber sido mayor que en el cultivo de *KΔphzM*; en las condiciones con 90 y 100% de *ΔlasR ΔrhIR* no se detectó la producción de esta enzima. En la figura 27B se observa la concentración de proteasa alcalina alcanzada en el medio de cultivo a las 24 h de cada condición y en las competencias de 10 y 50% mostró una sobreproducción al igual que en el caso de la elastasa, sobretodo en la

condición de 50%. En cuanto a la condición de 90% se pueden observar bajos niveles de este factor de virulencia.

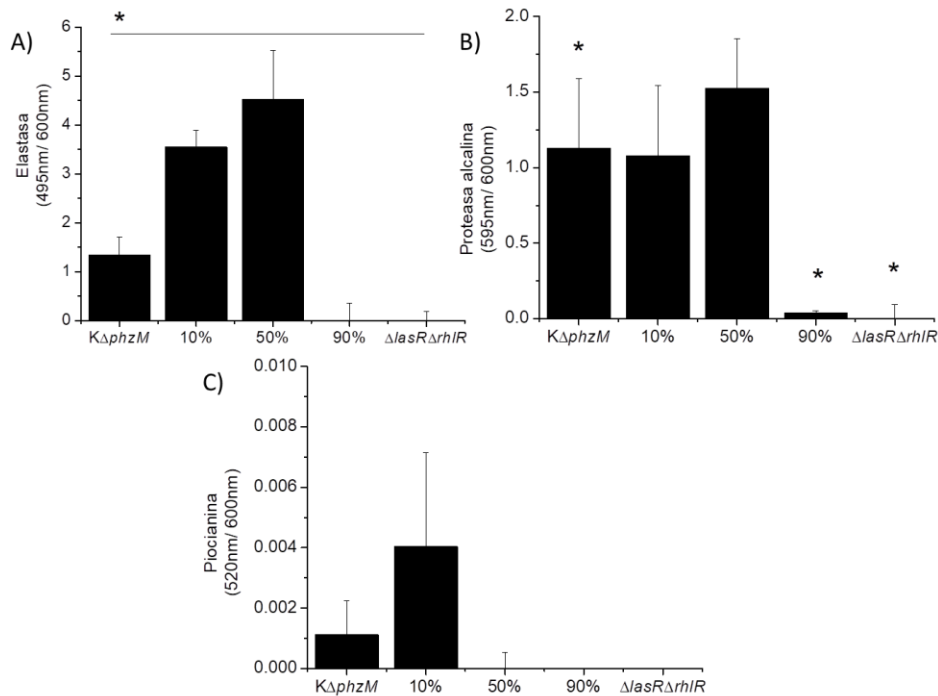


Figura 27 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de las curvas de crecimiento de *KΔphzM*, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5% incubados a 37°C y 200 rpm, (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=3-33, B) *Proteasa alcalina* n=3-33 y C) *Piocianina* n=3-5; *Mann-Whitney p<0.05).

Mientras tanto, en la figura 27C se observa la producción de piocianina, en este experimento la cepa utilizada carece del gen específico para la síntesis de piocianina, sin embargo, en las condiciones con 100% y 90% de *KΔphzM* se detectó cierta presencia de piocianina aunque en una muy disminuida cantidad que puede ser desestimada (una disminución aproximada del 99.25% con respecto a la producción de la cepa WT).

Además de los factores de virulencia se midieron las proporciones de $\Delta lasR \Delta rhIR$ a lo largo de las curvas de crecimiento, estas se muestran en la figura 28, donde se observa que las proporciones finales de la población doble mutante en los cultivos fueron mayores que las iniciales. En el caso de la competencia iniciada con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ la proporción final es de casi 60% (58.55%), la competencia iniciada con 50% alcanzó una proporción final de 73% y la proporción final de la competencia de 90% fue de 92%, estos resultados muestran el mismo patrón observado en los datos obtenidos de las competencias con la cepa WT, es decir, en casi todas las condiciones la proporción final fue mayor que la proporción inicial, esto como resultado del *cheating* por parte de la cepa mutante ($\Delta lasR \Delta rhIR$), pero en este caso (*KΔphzM*) todas las proporciones finales superaron a las

obtenidas en las competencias con la cepa WT, sugiriendo que el limitante para su crecimiento estaba disminuido pero no ausente del todo ya que en ningún caso se alcanzó el 100% de la población total del cultivo.

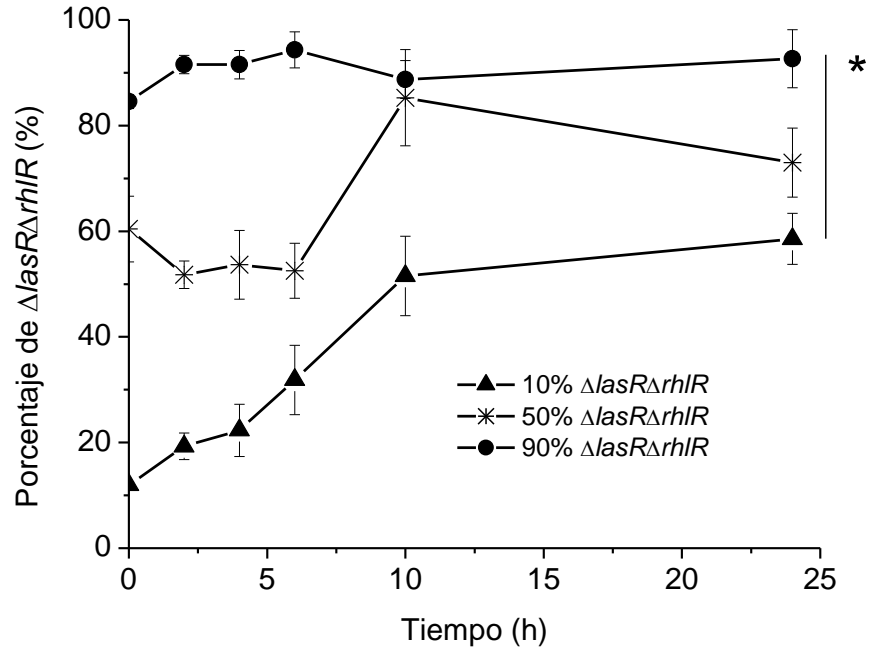


Figura 28 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en competencias entre $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, 10% n=3-18, 50% n=3-4 y 90% n=3-5; χ^2 p<0.001).

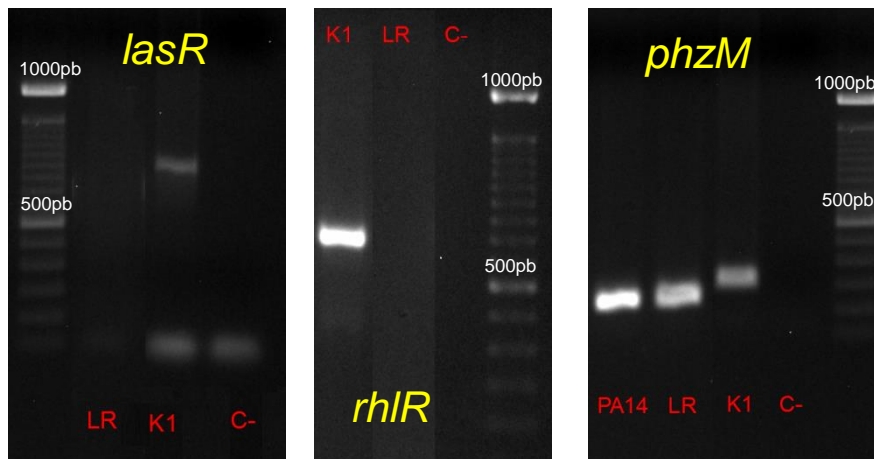


Figura 29 Electroforesis en gel de agarosa 1%, PCR de cepas PA14K (PA14), $K\Delta phzM$ (K1) y $\Delta lasR \Delta rhIR$ (LR) con los genes *lasR* (706pb), *rhIR* (675pb) y *phzM* (234pb) para la determinación de las proporciones en las competencias entre estas cepas. Control negativo sin DNA (C-).

En este experimento también se hizo un control midiendo los factores de virulencia de la cepa $K\Delta phzM$, para observar si no habían cambiado las producciones de la elastasa y proteasa alcalina a raíz de la mutación del gen $phzM$ y también para confirmar la ausencia de esta última, estos resultados se muestran en la figura 30. Además, en la figura 29 se muestra los geles después de la electroforesis de algunos aislados para identificar las proporciones de las competencias utilizando los genes $lasR$ y $rhIR$ para diferenciar entre $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ y también el gen $phzM$ para comprobar que se tratara de la cepa $K\Delta phzM$.

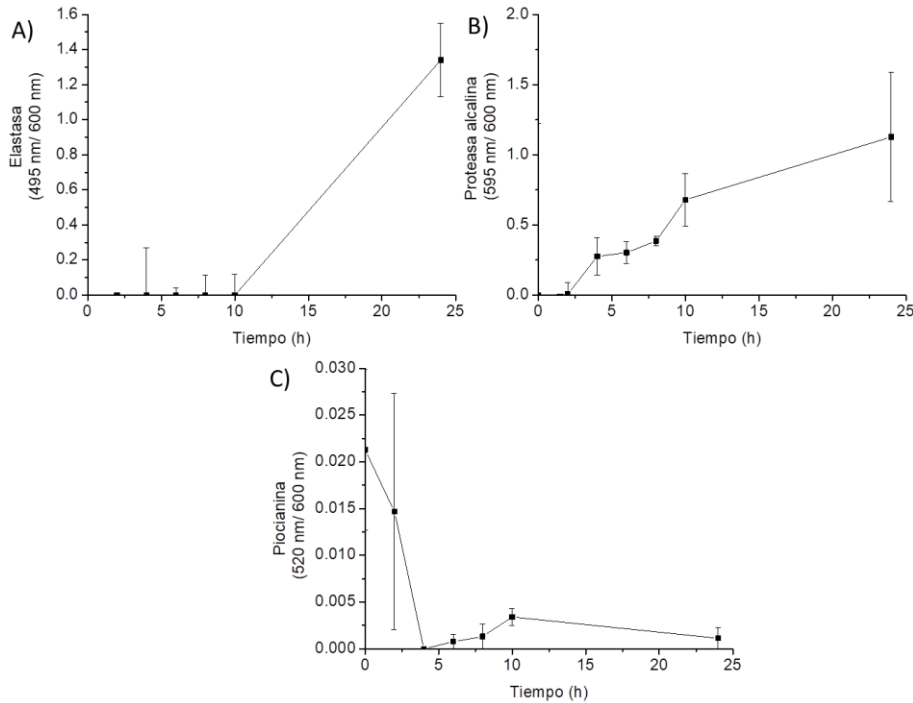


Figura 30 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento, determinados de los cultivos de $K\Delta phzM$ en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=3, B) Proteasa alcalina n=3-7 y C) Píocianina n=3).

En la figura 30A se muestran los resultados de la elastasa y se puede observar que la producción de esta fue indetectable casi todo el tiempo de cultivo, aunque a las 24 h esta concentración fue mayor que la observada en la figura 24A, correspondiente al cultivo de la cepa WT (PA14K). Mientras tanto, la proteasa alcalina (Figura 30B) muestra una producción paulatina, sin mostrar el pico de producción a las 6 h como en el cultivo WT, hasta que alcanzó su mayor concentración a las 24 h. Este valor fue muy parecido a la producción obtenida por parte de la cepa WT (PA14K), por lo que la mutación no afecta su producción sugiriendo también que puede sustentar su crecimiento y el de las mutantes sin quórum como en el caso de la cepa WT, también sugiere que la disminución en el crecimiento de las curvas no se debe a la disminución de este factor. La píocianina (Figura 30C) en esta cepa, debió ser indetectable pero se pudo observar muy poca cantidad, misma que podría ser desestimada.

La producción de proteasa en estas competencias, muestra el mismo patrón que en las competencias con presencia de piocianina, solo que en este caso se ve una producción aún mayor que en los experimentos anteriores, posiblemente por el aumento en la población mutante, al crecer sin la restricción que generaba la presencia de la piocianina, haciendo evidente que el efecto de la inanición por parte de las células productoras, es lo que fomenta el aumento en las proteasas, a pesar de que esta cepa (*KΔphzM*) muestra aparentemente menor producción de proteasa en su cultivo individual.

La razón para hacer las competencias con la cepa mutante sin piocianina era saber si la presencia de esta tenía algún efecto negativo sobre la población sin quórum, así que al comparar las proporciones en las competencias con la mutante (*KΔphzM*) con las proporciones obtenidas en los cultivos con la cepa productora (PA14K) se observó que en el caso donde hubo ausencia de piocianina la cepa sin quórum (*ΔlasR ΔrhIR*) tuvo un mayor crecimiento, esto se puede ver más claramente en la figura 31 donde se comparan estas dos condiciones.

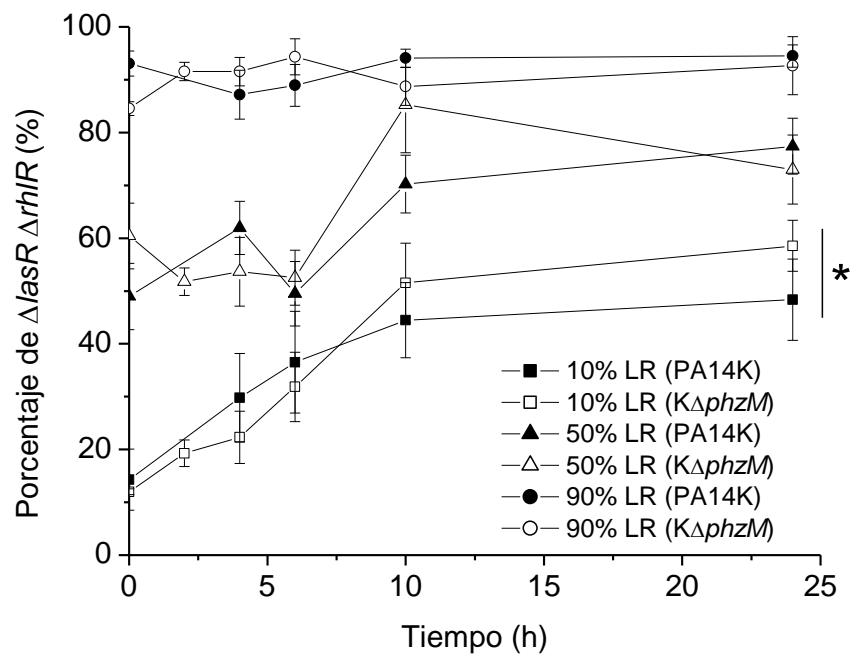


Figura 31 Comparación del porcentaje de *ΔlasR ΔrhIR* en co-cultivo con PA14K (relleno) o *KΔphzM* (hueco) (* χ^2 $p < 0.001$).

Como se puede observar la condición en la que hay un aumento mayor es cuando se inició con un porcentaje de 10% de *ΔlasR ΔrhIR*, donde cambió de 48.36% en presencia de piocianina a 58.55% en ausencia de piocianina. En el caso del cultivo con 50% inicial de *ΔlasR ΔrhIR* cambió de 77.39% a 73% a las 24 h, en esta condición la proporción no fue más elevada a ese tiempo pero a las 10 h sí se

puede ver que fue un poco mayor cuando la piocianina estaba ausente. Para el caso de la competencia iniciada con 90% de *ΔlasR ΔrhIR*, en ninguna de las condiciones se vio un aumento significativo, lo cual se puede explicar porque en las dos condiciones la producción de proteasa alcalina estuvo muy disminuida aproximadamente 0.06 y 0.04 (595 nm/ 600 nm) en presencia y ausencia de piocianina respectivamente, lo que sugiere que esta producción de proteasa no es suficiente para sustentar el oportunismo de las mutantes sin quórum y posiblemente también el crecimiento de las cepas con quórum, ya que el crecimiento del cultivo total también está disminuido.

8.2.2. Adición de piocianina

Los resultados obtenidos hasta ese momento sugerían que la piocianina sí afecta negativamente el aumento de la población sin quórum, por lo que después se probó una adición de piocianina a las competencias, específicamente a la competencia iniciada con 10% de *ΔlasR ΔrhIR*, donde se vio un efecto más claro cuando se compararon las dos condiciones (con o sin piocianina). Para llevar a cabo estos experimentos extrajimos piocianina de cultivos puros de PA14K en caseína utilizando la misma técnica que se utilizó para su detección (extracción cloroformo-ácido clorhídrico). En la figura 32 se muestran los resultados de la adición de piocianina en las curvas de crecimiento; como control en este experimento se agregó el mismo volumen de agua para evaluar el efecto de la dilución por el volumen agregado y descartar la dilución de la proteasa en el cultivo; tanto la adición del agua como de la piocianina fueron a las 4 h del cultivo, es decir, dos horas antes de alcanzar el pico en la producción de piocianina que naturalmente se daría en cultivos WT.

Se puede observar que efectivamente la adición del líquido (agua o piocianina) tiene un efecto en el crecimiento del cultivo, ya que en los dos casos hubo una disminución, esto comparándolo con el cultivo al que no se le agregó nada (10% *ΔlasR ΔrhIR*), sin embargo, en el caso de las adiciones de la piocianina (500 y 1000 μ l) no hubo una diferencia observable en el crecimiento del cultivo. Mientras tanto, cuando se cuantificó el porcentaje de la cepa sin quórum (*ΔlasR ΔrhIR*) para ver las diferencias en las distintas condiciones sí se observó algo diferente. En la figura 33 se muestran los porcentajes de *ΔlasR ΔrhIR* a lo largo del tiempo de cultivo y podemos observar que la presencia de agua disminuyó el porcentaje de la población sin quórum de 58.55% (10% sin agregar nada) a 49.8%, es decir, casi un 10% solo por la dilución del cultivo, mientras que el porcentaje en los cultivos donde se les adicionó piocianina disminuyeron a 39% y 15.7% para los volúmenes agregados de 500 y 1000 μ l de piocianina respectivamente, quitando el efecto de la dilución su disminución real fue de un 20% y un 45% respectivamente, esto sugiere fuertemente que la piocianina restringe el aumento de la población sin quórum y su concentración también influye en esta restricción, es decir, a mayor concentración agregada mayor es la disminución del porcentaje de células sin quórum.

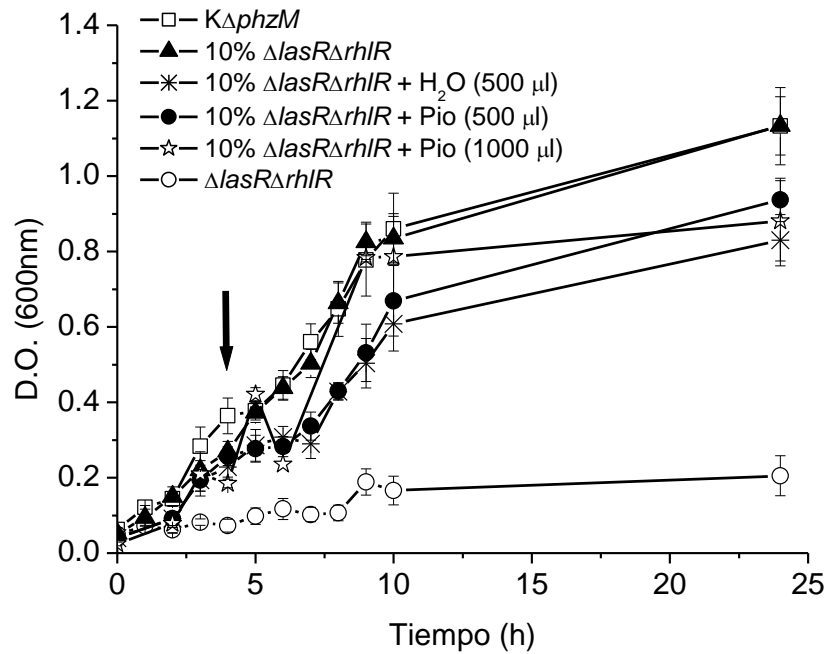


Figura 32 Curvas de crecimiento de $K\Delta phzM$, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y las competencias iniciadas con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ adicionadas con 500 μl de H_2O y 500 y 1000 μl de piocianina (pio) a las 4 h de cultivo (flecha), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h; (Promedio \pm error típico, H_2O n=6-10, 500 μl piocianina n=6-10 y 1000 μl piocianina n=4).

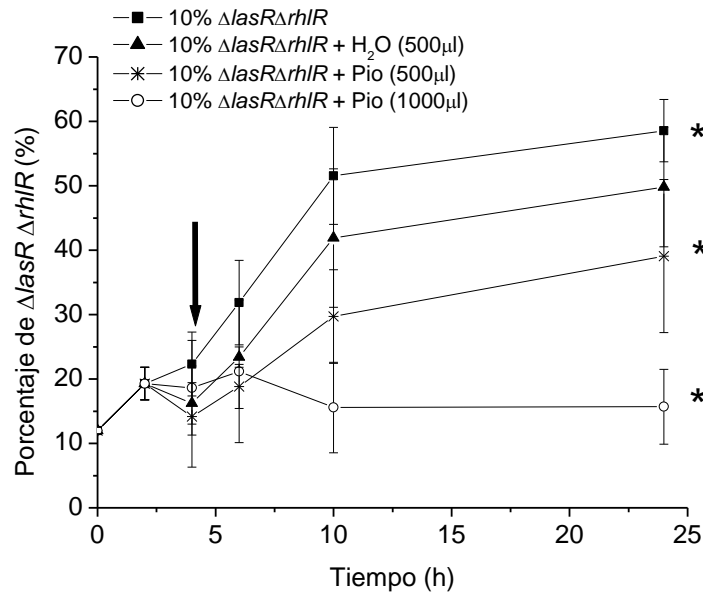


Figura 33 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en competencias entre $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína adicionados con H_2O , 500 μl de piocianina y 1000 μl de piocianina a las 4 h (flecha),

iniciados con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, H₂O n=4-8, 500 μ l piocianina n=4-8 y 1000 μ l piocianina n=4; χ^2 p<0.001).

Cultivo/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (h)
10% $\Delta lasR \Delta rhIR$	0.26 \pm 0.02*	5.22 \pm 1.62*
10% $\Delta lasR \Delta rhIR$ + H ₂ O	0.35 \pm 0.03*	2.08 \pm 0.2*
10% $\Delta lasR \Delta rhIR$ + 500 μ L piocianina	0.41 \pm 0.07*	2.01 \pm 0.25*
10% $\Delta lasR \Delta rhIR$ + 1000 μ L piocianina	0.56 \pm 0.09*	1.32 \pm 0.09*

Tabla 8 Parámetros determinados de las competencias iniciadas con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ y 90% de $K\Delta phzM$ y cultivadas por 24 h a 37°C y 200 rpm en medio de caseína adicionadas con H₂O, 500 μ l y 1000 μ l de piocianina a las 4 h de cultivo (Promedio \pm error típico, n=3-10; *Mann-Whitney p<0.05).

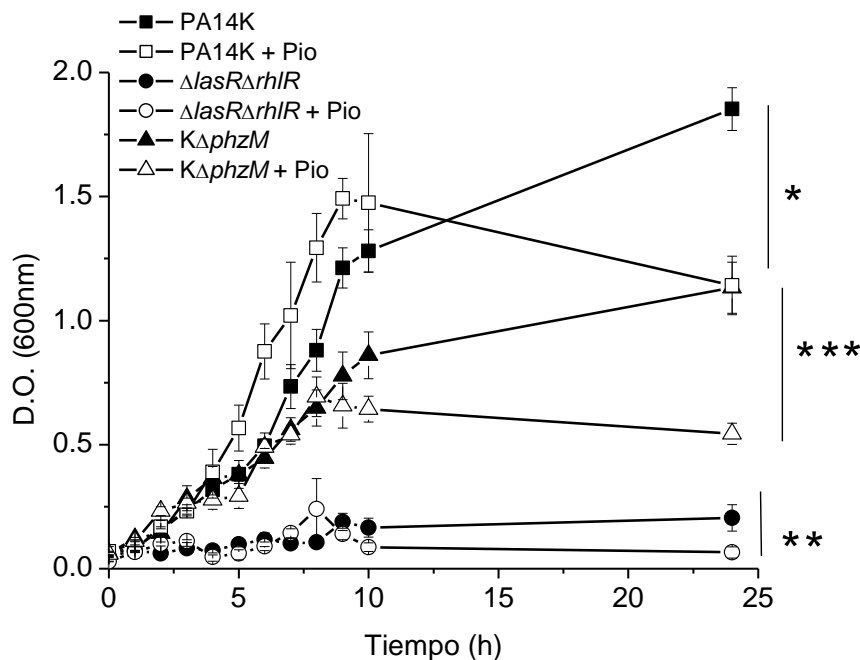


Figura 34 Curvas de crecimiento de PA14K, $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5% sin piocianina agregada (rellenas) y con piocianina agregada (50 μ M) (huecas), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, n=6-33; *, **, *** Mann-Whitney p<0.05).

Adicionalmente en este experimento también se llevaron a cabo curvas de crecimiento de cultivos puros de las cepas utilizadas (PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y $K\Delta phzM$) a las cuales se les agregó piocianina (50 μ M) al inicio del cultivo. En la figura 34 se puede observar que el efecto de la piocianina agregada en las cepas WT (con y sin producción de piocianina) no afectó sus crecimientos hasta las 24 h del cultivo donde se observa una disminución significativa con respecto al cultivo sin piocianina agregada. Mientras tanto, en el cultivo de $\Delta lasR \Delta rhIR$, la curva de

crecimiento adicionada con piocianina se mantuvo ligeramente por debajo de la curva sin la adición de este factor de virulencia en la mayor parte del tiempo. Esta disminución en el crecimiento fue más evidentemente al final del cultivo cuando la densidad óptica obtenida fue menor que la registrada al inicio de la curva, lo que sugiere que esta concentración de piocianina es capaz de disminuir la cantidad de células presentes en el cultivo.

Por otro lado, la diferencia entre las proporciones finales del cultivo control y los adicionados con piocianina, confirman el efecto de este factor de virulencia sobre la población *cheater*, debido a que en ambos casos se ve una disminución de la cantidad de oportunistas, y además se demuestra que este efecto es dependiente de la concentración ya que cuando se le agregó un volumen mayor aumentando la concentración de piocianina, la disminución de los *cheater* es aún mayor; este efecto sabemos que es específico contra las dobles mutantes porque en la figura 34 se ve que la adición de una concentración de 50 μM no afecta el crecimiento de las cepas WT (con o sin producción de piocianina) solo hasta las 24 h mientras que a la doble mutante la afecta a lo largo de todo el tiempo de cultivo. Lo interesante en estas competencias es que a pesar de la disminución en la población oportunista el crecimiento se mantiene similar, lo que sugiere que evitar el aumento de los *cheater*, reestablece el equilibrio entre la obtención de nutrientes y el crecimiento (Tabla 8).

8.3. Mecanismo de acción de la piocianina sobre células sin sistemas de quórum activos ($\Delta lasR \Delta rhIR$)

Todos los experimentos realizados anteriormente sugieren fuertemente que la piocianina tiene un control negativo sobre la población sin quórum, por lo que basándonos en la capacidad de esta, para promover la generación de especies reactivas de oxígeno se cultivaron las competencias en un ambiente anaerobio para impedir la formación de estos compuestos y comprobar que el efecto negativo de la piocianina se debía a la formación de ROS a las que las mutantes sin quórum son particularmente sensibles (García-Contreras et al., 2015).

En la figura 35 se muestra la curva de crecimiento de los cultivos de PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ y también de las competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis; a estos cultivos se le agregó 40 mM KNO_3 para sustituir al oxígeno como último aceptor de electrones (Filiatrault et al., 2006). Se puede observar que el crecimiento en todas las condiciones disminuyó con referencia al crecimiento en aerobiosis, aproximadamente entre un 40% a 50%; pero siguen manteniendo la misma dinámica de los experimentos anteriores, es decir, a menor concentración de células con quórum menor fue el crecimiento del cultivo. En la figura 36 se muestra una fotografía de los cultivos en estas condiciones y se puede notar la presencia de la piocianina en los cultivos de PA14K, 10 y 50% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, aunque en esta última competencia se observa una menor cantidad; como se mencionó anteriormente este experimento se planteó para observar el

efecto de las especies reactivas de oxígeno por lo que la piocianina debía de estar presente.

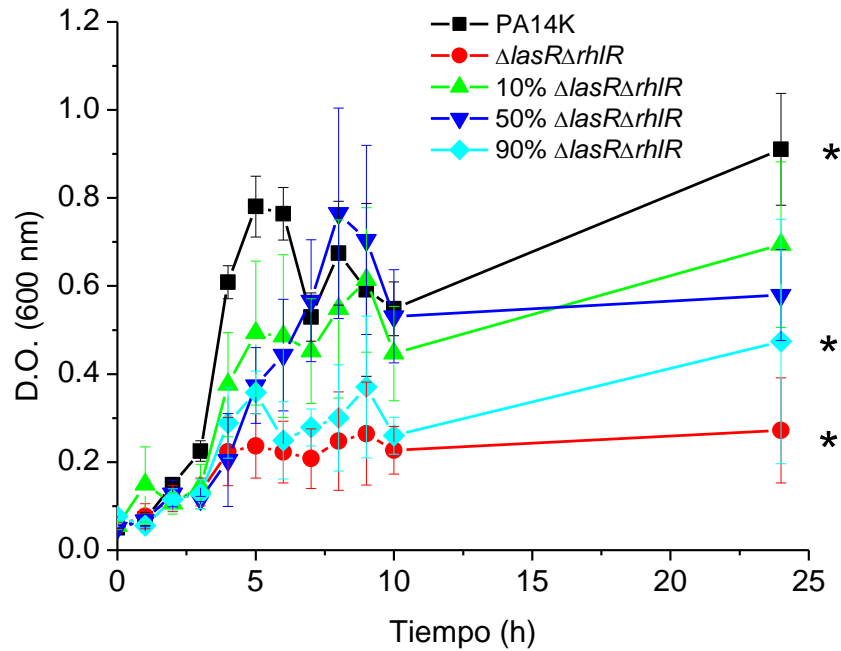


Figura 35 Curvas de crecimiento de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y las competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis en medio de caseína 0.5% adicionado con 40mM KNO_3 , incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-4).

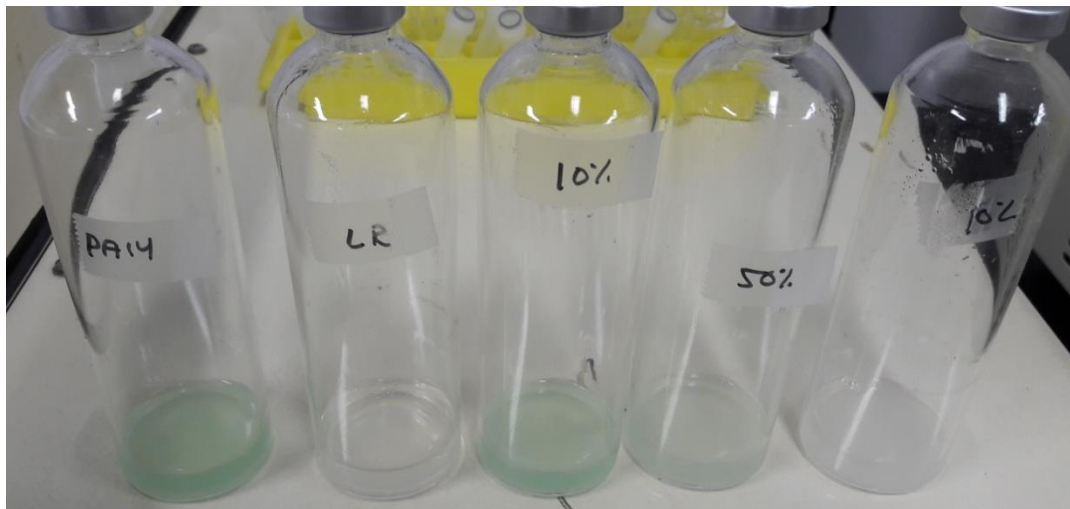


Figura 36 Fotografía de los cultivos de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y las competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis, en medio de caseína 0.5% adicionado con 40mM KNO_3 , incubadas a 37 °C y 200 rpm a las 24 h.

Los porcentajes de las células sin quórum también se midieron en este experimento a lo largo de toda la curva y los resultados obtenidos se muestran en la figura 37. En este experimento, al igual que en los demás experimentos se puede observar un aumento en los porcentajes de la población oportunista ($\Delta lasR \Delta rhIR$), solo que en este caso el aumento fue aún mayor, ya que en la competencia con células sin pirocianina el porcentaje final fue de 58, 73 y 90% para las condiciones de 10, 50 y 90% respectivamente, y en este caso fue de 66, 83 y 92%, sugiriendo fuertemente que el efecto negativo de la pirocianina contra las células sin quórum es por estrés oxidativo generado por la formación de especies reactivas de oxígeno (Figura 38).

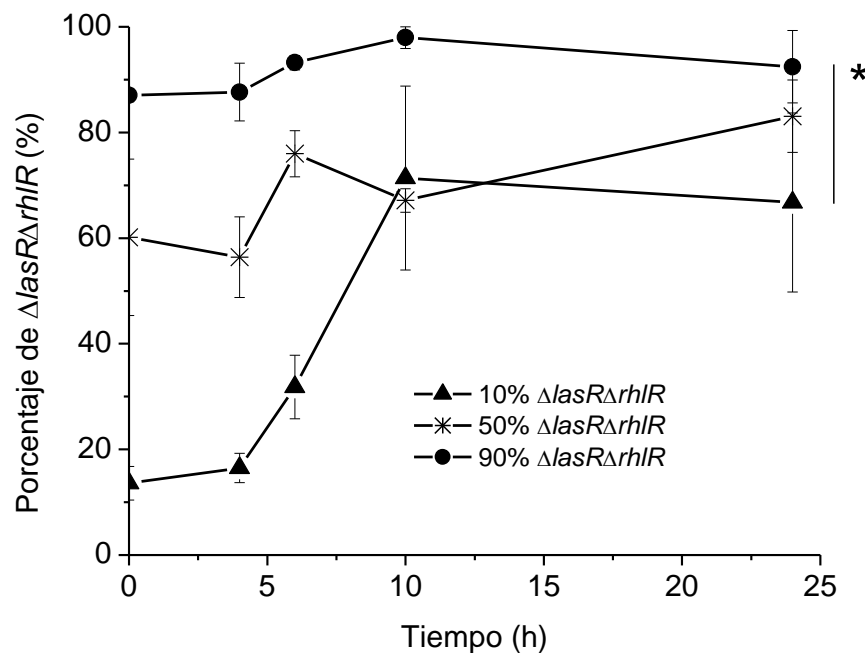


Figura 37 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5% adicionado con KNO_3 en anaerobiosis, iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-4; *Mann-Whitney p<0.05).

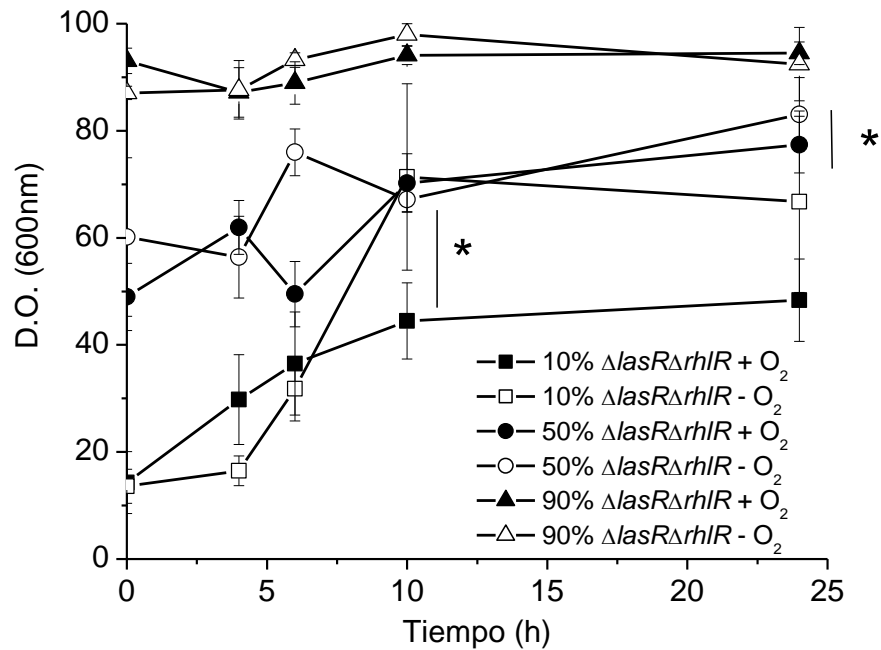


Figura 38 Comparación de porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en presencia (+ O_2) y ausencia (- O_2) de oxígeno en competencias con PA14K (Promedio error típico, $n=3-18$; $\chi^2 p<0.001$).

En este experimento se observó que a pesar de la disminución en el crecimiento debido a las condiciones anaeróbicas, estas mantuvieron el mismo patrón que en las anteriores competencias, es decir, el crecimiento sigue dependiendo de la presencia de células WT, sin embargo, en este caso los únicos que mostraron una diferencia significativa fueron el cultivo WT, la competencia con 90% y el cultivo $\Delta lasR \Delta rhIR$. En cuanto a los parámetros cinéticos las competencias con 50 y 90% fueron las únicas que mostraron una diferencia en la velocidad de crecimiento con respecto al cultivo WT, mientras que los tiempos de duplicación son diferentes para todos los cultivo con respecto al WT excepto la competencia de 10% (Tabla 9). Todos estos resultados concuerdan con lo obtenido en los experimentos en aerobiosis. Sin embargo, la frecuencia de *cheaters* si es diferente. A pesar de que esta población teóricamente tiene una aparente respuesta negativa frente a la disminución del oxígeno, debido a su nula activación de los sistemas de quórum Las y Rhl de los que dependen la transcripción de los genes responsables para la desnitrificación, estos individuos muestran un aumento en su porcentaje mayor que el que presentan cuando la piocianina es eliminada del cultivo a pesar que en estos cultivos está presente este factor de virulencia, sugiriendo fuertemente que es la formación de ROS lo que afecta selectivamente la frecuencia de su población. Otro dato interesante que muestra este resultado es que en la competencia de 10% se puede observar que no hay aumento de la población oportunista entre las 10 y las 24 h del cultivo, anteriormente se había observado esto también en los cultivos sobre todo en la competencia de 10% (PA14K vs $\Delta lasR \Delta rhIR$) y se había vinculado con la presencia de piocianina y su actividad de control sobre esta población, pero en este experimento no hay efecto de control

por parte de la piocianina por lo que este fenómeno puede estar relacionado con la concentración de nutrientes, es decir, que en esta competencia a las 10 h de cultivo es probable que disminuyera de manera significativa la fuente de carbono disponible limitando el aumento de los *cheaters* o entrara a fase estacionaria. Al mismo tiempo, esta competencia no muestra una diferencia de crecimiento con respecto a los cultivos WT en esta condición, esto quiere decir que crecen lo mismo, pero en este caso a diferencia de las demás competencias de 10%, la proporción de oportunistas es mucho mayor y aunque sabemos que la distribución de nutrientes no es igual entre los cultivo WT y las competencias, el aumento de las *cheaters* podría ser el que elimine esta diferencia entre los otros crecimientos en esta condición.

Cultivo/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
PA14K	$0.59 \pm 0.01^*$	$1.18 \pm 0.03^*$
10% $\Delta lasR \Delta rhIR$	0.45 ± 0.1	2.06 ± 0.79
50% $\Delta lasR \Delta rhIR$	$0.36 \pm 0.04^*$	$2.01 \pm 0.25^*$
90% $\Delta lasR \Delta rhIR$	$0.42 \pm 0.03^*$	$1.64 \pm 0.11^*$
$\Delta lasR \Delta rhIR$	0.12 ± 0.03	$9.76 \pm 5.09^*$

Tabla 9 Parámetros determinados de las competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ cultivadas en anaerobiosis en medio de caseína 0.5% por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=4; *Mann-Whitney p<0.05).

8.4. Efecto de la piocianina en la aparición de mutantes sin proteasa

En la naturaleza estas dos poblaciones (cooperadoras y oportunistas) conviven cotidianamente y aparentemente el control de la población no cooperadora está dado por la presencia de compuestos extracelulares (Knight et al., 1979; Harrison et al., 2006; Diggle et al., 2007; Sandoz et al., 2007; Rumbaugh et al., 2009; Mellbye et al., 2011; Recinos et al., 2012; García-Contreras et al., 2015; Smalley et al., 2015; Wang et al., 2015 a). Pero también se ha demostrado que existe la aparición de células no cooperadoras a partir de cultivos iniciados solo con células cooperadoras (Wang et al., 2015 a), por lo que debido a los resultados publicados decidimos comprobar si la piocianina también tenía un efecto en el control de la aparición de células no cooperadoras, en este caso no productoras de proteasa, en cultivos iniciados solo con células con quórum. En la figura 39, se muestran los resultados obtenidos de este experimento, que constaba en iniciar cultivos con células WT (PA14K) o células sin producción de piocianina ($K\Delta phzM$) con y sin la adición de piocianina (50 μ M) en medio de cultivo de caseína 0.5% y cada 24 h resebrar el cultivo en las mismas condiciones (siempre iniciando con el mismo número de células) y observar la aparición de mutantes no productoras de exoproteasas a lo largo de 15 días. Como podemos observar los cultivos de PA14K con y sin piocianina adicionada mostraron una aparición de mutantes sin proteasa a los 8 días pero los cultivos adicionados con piocianina mostraron siempre un número menor de mutantes a diferencia de los cultivos sin piocianina adicionada. En el caso de los cultivos de $K\Delta phzM$ se puede

ver una diferencia grande en cuanto a la cantidad de mutantes que aparecieron con respecto a los cultivos de PA14K siendo las primeras menores. Estos resultados confirman el control negativo por parte de la pocianina sobre el crecimiento de las células sin quórum al mantener disminuida su proporción, en comparación a las curvas sin pocianina adicionada, sin embargo, no sobre su aparición en la cepa silvestre.

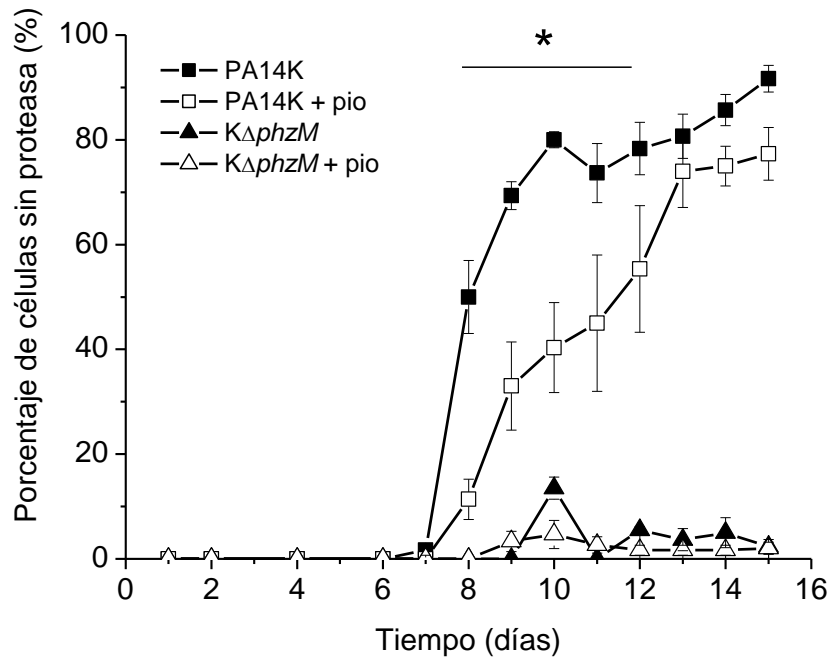


Figura 39 Porcentaje de células sin producción de proteasas determinadas en cultivos seriados de PA14K y *KΔphzM* en medio de caseína 0.5% sin (rellena) y adicionado con 50μM de pocianina (pio) (huecas), resemebradas cada 24 h a lo largo de 15 días, incubadas a 37°C y 200 rpm (Promedio ± error típico, n=3; *Mann-Whitney p<0.05).

En la figura 40 se puede observar que el crecimiento a las 24 h en los cultivos de PA14K, con y sin adición de pocianina, disminuyó como consecuencia de la aparición de mutantes sin proteasas mostrando una relación entre la cantidad de mutantes y el crecimiento ya que cuanto mayor fue la cantidad de mutantes presentes en el cultivo, menor fue el crecimiento celular obtenido. Sin embargo, en los cultivos de *KΔphzM*, el crecimiento cada 24 h no tuvo variaciones tan evidentes aunque esto también tiene relación con la presencia de mutantes sin proteasa, porque como se observa en la figura 39, en estos cultivos la aparición de mutantes fue mucho menor que en la cepa productora de pocianina, pero la curva con pocianina adicionada siempre mostró un crecimiento menor sin importar la presencia de mutantes sin proteasa.

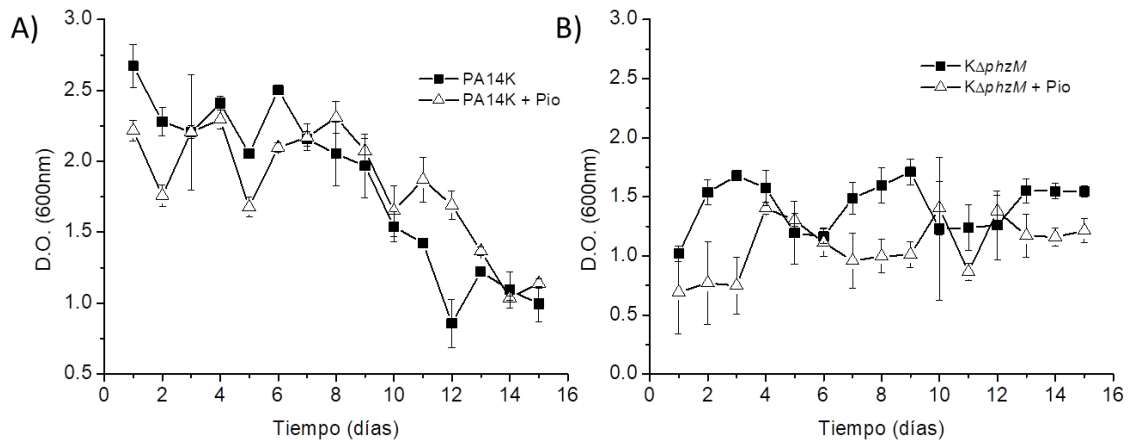


Figura 40 Crecimiento determinado cada 24 h a lo largo de 15 días de cultivos de PA14K y *KΔphzM* con presencia y ausencia de pirocianina en medio de caseína 0.5%, incubados a 37°C y 200 rpm, (Promedio \pm error típico, n=3).

8.5. Competencia entre *P. aeruginosa* con otras especies (*E. coli* DH5 α y *S. aureus*)

Como sabemos en la naturaleza ninguna bacteria se encuentra aislada del resto, por lo que surgió la duda de si *P. aeruginosa* era capaz de tener el mismo comportamiento en presencia de otros microorganismos?, es decir, fomentar el oportunismo por la expulsión de bienes públicos y de mantener un control sobre la población oportunista mediante la producción de pirocianina con otras especies. Para esto se utilizaron las cepas *E. coli* DH5 α y *S. aureus* de un aislado clínico y se realizaron competencias como se habían hecho con la cepa mutante *ΔlasR ΔrhIR*.

Primero se cultivó a *E. coli* DH5 α y *S. aureus* en el medio de cultivo (caseína 0.5%) solo y adicionado con una proteasa para comprobar que estas dos cepas necesitan una proteasa externa, como en el caso de la mutante sin quórum de *P. aeruginosa*, para crecer en este medio y también que son capaces de utilizar los productos de una proteasa externa. En la figura 41 se muestran las curvas de crecimiento, donde se puede observar que las dos cepas (*E. coli* DH5 α y *S. aureus*) fueron incapaces de crecer solas en el medio de caseína como se observó en el caso de la mutante sin quórum de *P. aeruginosa*, pero al agregar la proteasa externa fueron capaces de utilizar los productos de la degradación de la caseína como fuente de carbono y crecer incluso más que la cepa WT productora de proteasa (PA14K), en el caso de *E. coli*.

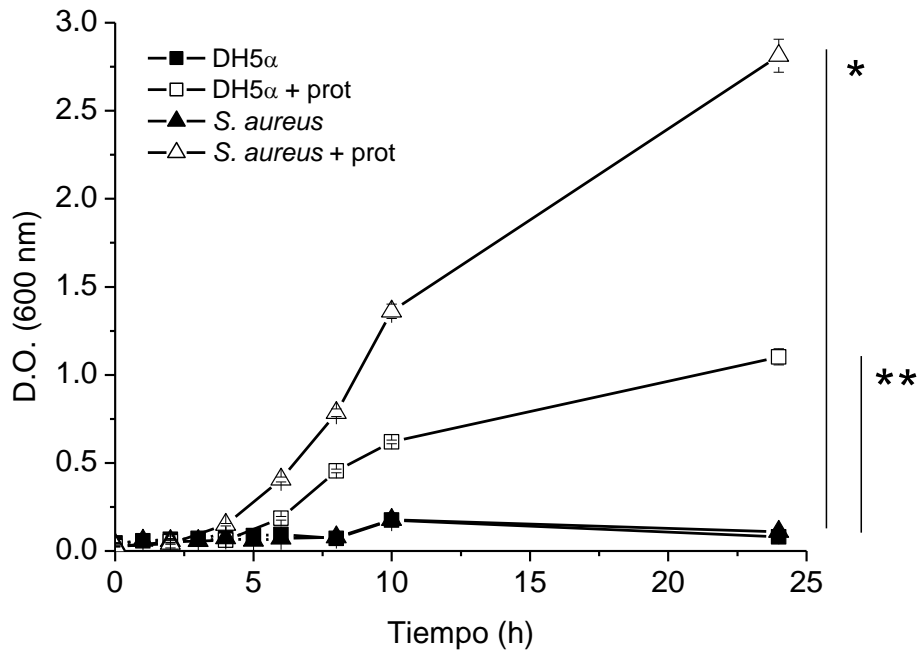


Figura 41 Curvas de crecimiento de *E. coli* DH5 α y *S. aureus* en las diferentes condiciones evaluadas (medio de caseína 0.5% (rellena) y medio de caseína 0.5% adicionado con 0.98 u/ ml de proteasa (prot) (huecas), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-7; *, **Mann-Whitney $p < 0.05$).

Habiendo comprobado que estas dos diferentes especies pueden ser capaces teóricamente de hacer *cheating*, a continuación se realizaron las competencias entre estas cepas y PA14K con las mismas proporciones: 10, 50 y 90% de las cepas oportunistas. En las figuras 42 y 43 se muestran los resultados obtenidos.

En la figura 42 se muestran las curvas de crecimiento de los cultivos solos de PA14K, *E. coli* DH5 α y sus competencias con 10, 50 y 90% de *E. coli* DH5 α inicial. Se puede observar que la cepa de *E. coli* DH5 α sola fue incapaz de crecer en este medio, como ya se había comprobado. En cuanto a las competencias la única que mostró una disminución en su crecimiento fue la iniciada con 90% de *E. coli* DH5 α . Estos resultados comparados con todas las anteriores competencias muestran una gran diferencia, ya que en este caso aparentemente la proporción inicial de la cepa deficiente de proteasa no interfirió mucho en el crecimiento del cultivo, exceptuando la condición de 90% de *E. coli* DH5 α donde sí se vio que influía en las primeras 10 h de cultivo pero a las 24 h casi se restableció por completo el crecimiento, ya que llegó a una densidad óptica parecida a las otras condiciones.

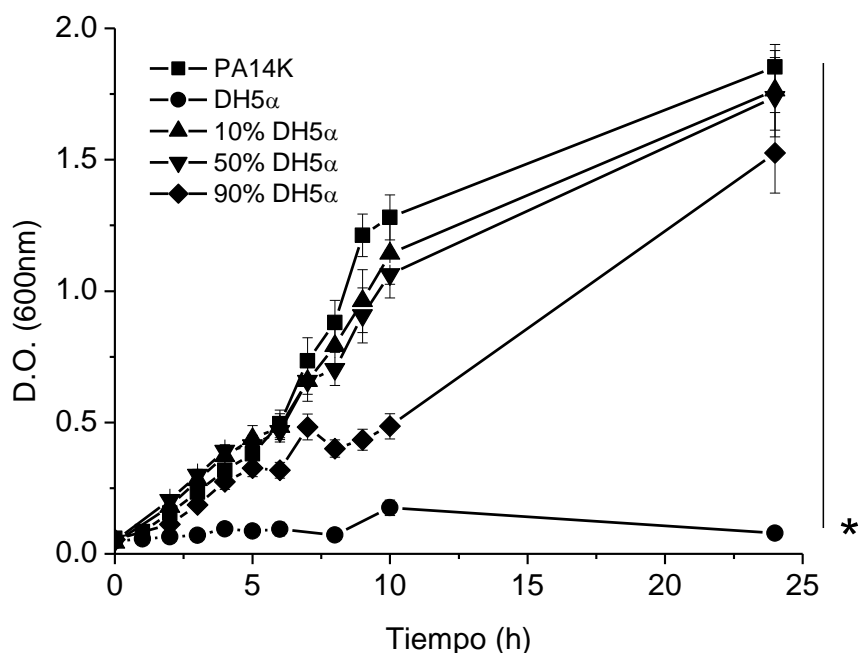


Figura 42 Curvas de crecimiento de PA14K y *E. coli* DH5α (DH5α) y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de *E. coli* DH5α, en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio ± error típico, n=3-32; *Mann-Whitney p<0.05).

En la figura 43 se pueden observar las curvas de crecimiento de los cultivos solos de PA14K, *S. aureus* y sus competencias. Como se puede ver, al igual que en el caso de *E. coli* DH5α, *S. aureus* fue incapaz de crecer solo en caseína. También en similitud con las competencias de *E. coli* DH5α, *S. aureus* mostró una dinámica diferente a todas las competencias realizadas anteriormente; se puede observar que no importó la proporción inicial de la cepa no productora de proteasa, ya que el crecimiento a las 24 h fue el mismo que el cultivo solo de PA14K para todas las competencias, aunque en el caso de la competencia iniciada con 90% de *S. aureus*, la curva se mostró por debajo de las demás sugiriendo que al igual en el caso de *E. coli* DH5α la velocidad de crecimiento tal vez fue menor pero solo antes de las 10 h de cultivo.

Del mismo modo que en las competencias anteriores, en estos experimentos se midieron los factores de virulencia (elastasa, proteasa alcalina y piocianina) a las 24 h del cultivo, estos resultados se muestran en las figuras 44 y 45 para *E. coli* DH5α y *S. aureus* respectivamente.

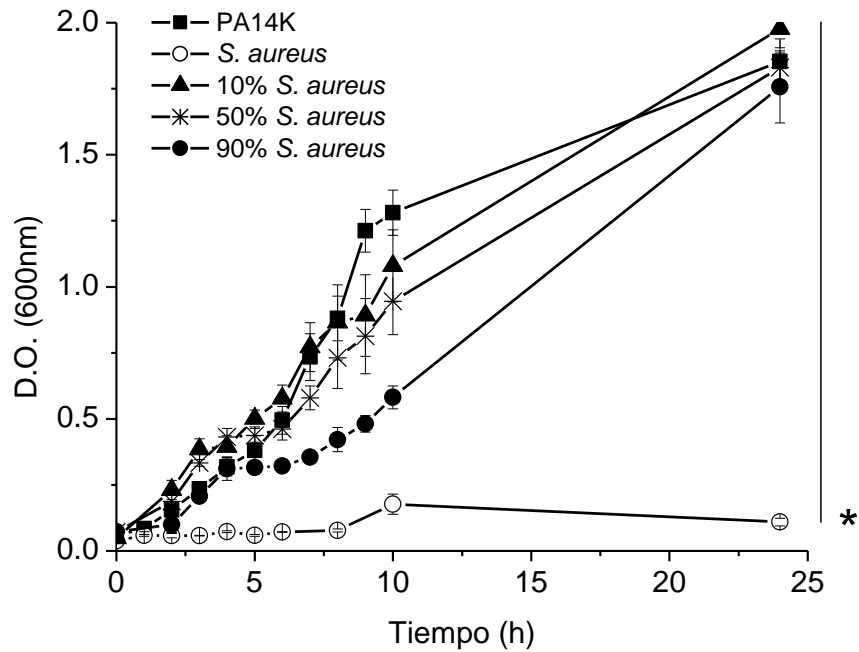


Figura 43 Curvas de crecimiento de PA14K, *S. aureus* y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de *S. aureus*, en medio de caseína 0.5%, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-32; *Mann-Whitney p<0.05).

La figura 44A muestra la producción de elastasa a las 24 h y podemos notar que en las competencias la producción de esta enzima estuvo muy disminuida en comparación con el cultivo puro de PA14K; en este caso a diferencia de las anteriores competencias no se observa que estas condiciones estén estimulando la activación del sistema de quórum Las, sugiriendo que la presencia de *E. coli* interfiere con este sistema o que en las otras competencias había algo que estimulaba esa sobreproducción. La figura 44B, muestra la producción de proteasa alcalina a las 24 h y podemos observar que al igual que en el caso de la elastasa, la proteasa alcalina también estuvo disminuida en las competencias sugiriendo una intervención por parte de *E. coli* en el sistema de quórum Las. En cuanto a la producción de pirocianina, que se muestra en la figura 44C, se puede observar que no hubo una aparente diferencia en la producción de esta, en ninguna de las tres competencias comparándolas con la producción de pirocianina en el cultivo puro de PA14K, esto sugiere que en las condiciones con menor proporción inicial de PA14K hubo un aumento en su producción, suponiendo que esta población no cambió a lo largo del tiempo de cultivo.

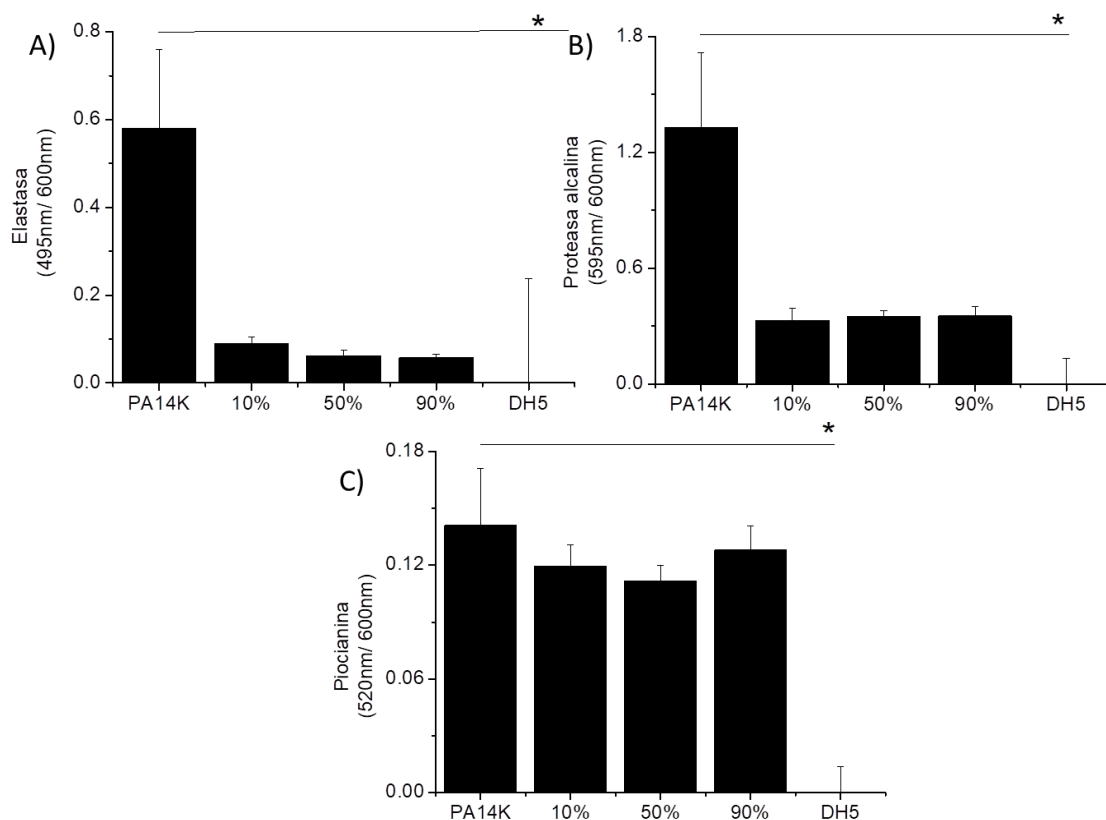


Figura 44 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de los cultivos de PA14K, *E. coli* DH5 α y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de *E. coli* DH5 α en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm, (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=3-17, B) Proteasa alcalina n=3-16 y C) Píocianina n=3-7; *Mann-Whitney p<0.05).

La producción de los factores de virulencia en las competencias con *S. aureus* se muestran en la figura 45. La figura 45A muestra la producción de elastasa y podemos observar que el cultivo con mayor producción de elastasa fue el de *S. aureus* solo, inclusive más que el cultivo de PA14K, esto debido a que *S. aureus* tiene la capacidad de producir diferentes elastasas que le facilitan llevar a cabo las infecciones periodontales y en pulmón (Hartman et al., 1977), pero en el medio de cultivo fue incapaz de degradar la caseína para la obtención de nutrientes. Con base en esto se podría esperar que los cultivos entre mayor proporción inicial de *S. aureus*, mayor cantidad de elastasa tendrían pero los resultados obtenidos muestran que esto no fue así, ya que en las tres competencias la producción fue muy poca. Mientras tanto, en la figura 45B se puede observar que el cultivo con mayor producción de proteasa es el cultivo de PA14K y que las competencias produjeron solo un 25% aproximadamente de la producción de PA14K. A diferencia de las competencias anteriores la producción de proteasa no tiene relación con la cantidad de células con quórum lo que sugiere que *S. aureus* al igual que *E. coli* interfiere en la producción de proteasa, es decir, con el sistema de quórum Las o que en estos casos no existe una sobre estimulación como en el

caso de las competencias con la mutante de quórum $\Delta lasR \Delta rhIR$. En la figura 45C podemos observar la producción de piocianina y se puede ver que en el cultivo de PA14K, así como en las competencias, se produjo casi la misma cantidad sugiriendo que el sistema de quórum Rhl está sobre produciendo piocianina en las competencias sobre todo cuando la proporción inicial de PA14K fue baja (10%), suponiendo que la cantidad de las poblaciones no cambió a lo largo del tiempo de cultivo.

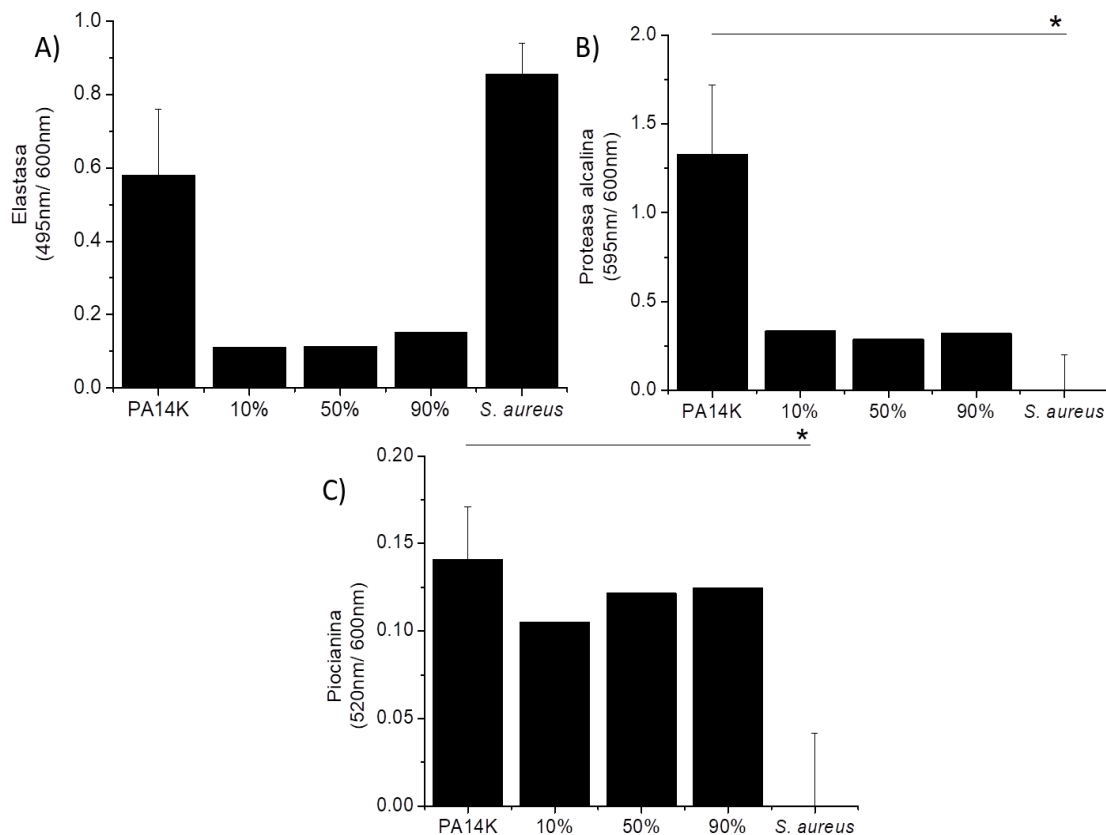


Figura 45 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de los cultivos de PA14K, *S. aureus* y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de *S. aureus* en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm, (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=3-17, B) Proteasa alcalina n= 3-16 y C) Piocianina n=3-6; *Mann-Whitney p<0.05).

Para poder observar si estas dos especies son capaces de aprovecharse de las exoproteasas producidas por la cepa PA14K al igual que su mutante sin quórum ($\Delta lasR \Delta rhIR$), se midieron las proporciones tanto de *E. coli* DH5 α como de *S. aureus* a lo largo de todo el tiempo de cultivo, utilizando las placas de LB-leche (Figura 46) y los resultados obtenidos se pueden observar en las figuras 47 y 48 respectivamente.

En la figura 47 se observa que *E. coli* DH5 α no fue capaz de aprovecharse de los bienes públicos de PA14K, porque en todas las competencias no se observó el

aumento de la población sino todo lo contrario, se pudo ver que a partir de la 4ta h disminuyó más de la mitad de la proporción inicial de *E. coli* DH5 α en todos los casos, así como a las 24 h en ninguna de las competencias hubo presencia de *E. coli* DH5 α , sugiriendo que pudiera haber alguna sustancia que detenga el aumento y elimine a *E. coli* DH5 α del cultivo probablemente producida por PA14K.

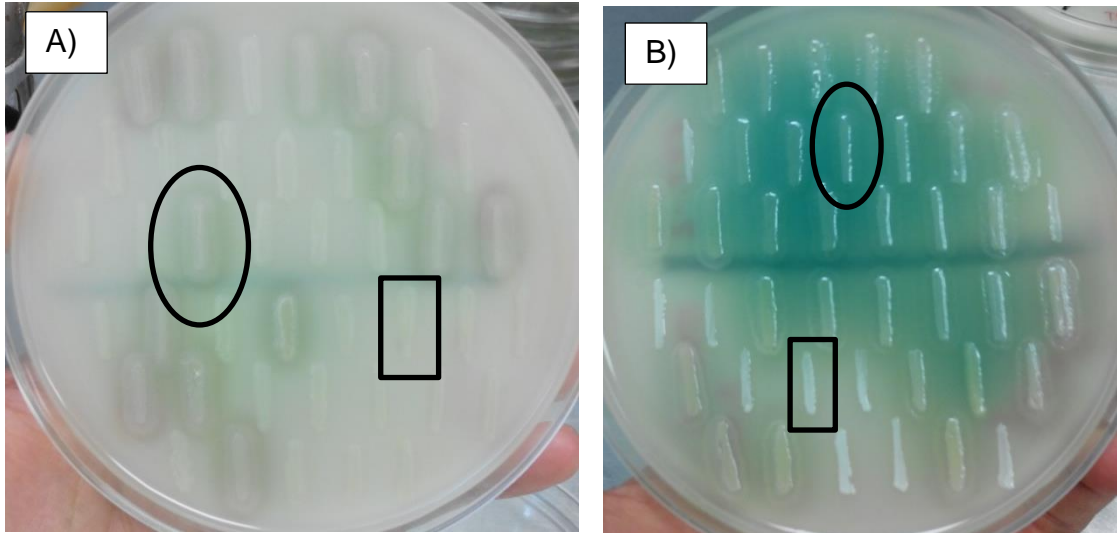


Figura 46 Apariencia de PA14K (ovalo), A) *E. coli* DH5 α (rectángulo) y B) *S. aureus* (rectángulo) en cajas con LB-leche, incubadas a 37°C por 24 h.

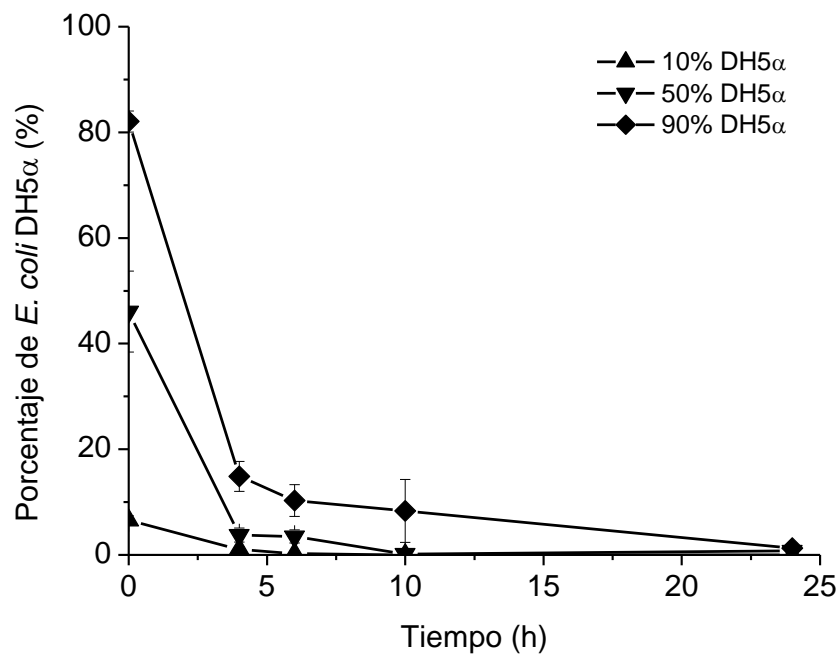


Figura 47 Proporciones de *E. coli* DH5 α en competencias con PA14K y *E. coli* DH5 α en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de *E. coli* DH5 α , incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, 10% n=11-13, 50% n=3-19 y 90% n=10-22).

En la figura 48 podemos observar las proporciones de *S. aureus* a lo largo del tiempo de cultivo y al igual que en el caso de las competencias con *E. coli* DH5 α , esta cepa tampoco fue capaz de aprovecharse de los bienes públicos de PA14K, ya que no aumentó su población a lo largo del cultivo. Sin embargo, en estas competencias también podemos ver que la población disminuyó en su totalidad a las 24 h, sugiriendo que en estas competencias también hay alguna sustancia que limita el crecimiento de *S. aureus* y que elimina su población completamente.

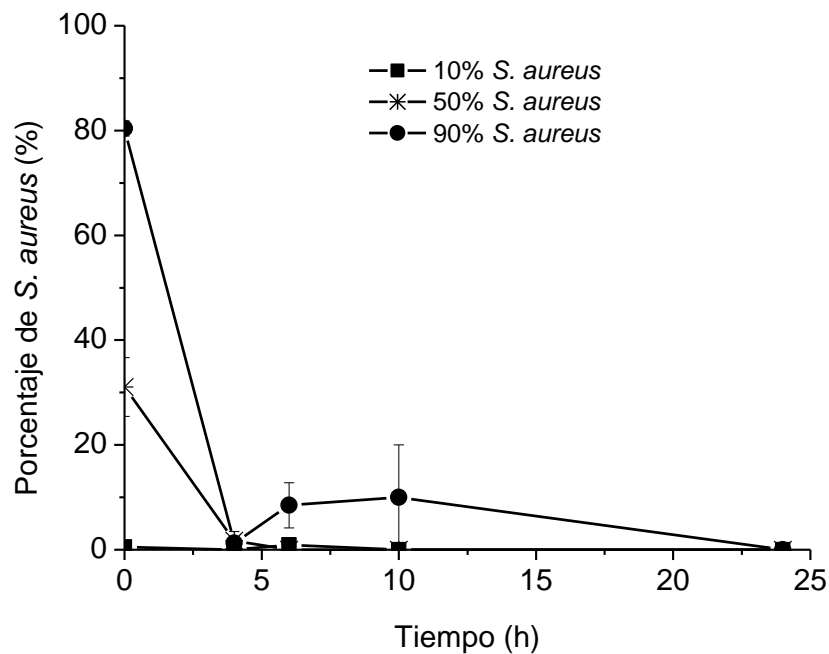


Figura 48 Proporciones de *S. aureus* en competencias con PA14K y *S. aureus* en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de *S. aureus*, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, 10% n=4-5, 50% n=3-5 y 90% n=5).

La producción de la piocianina que se observó sugiere que este factor tiene actividad bacteriostática y bactericida en al menos estas dos especies. Adicionalmente se llevó a cabo un experimento control donde se creció a las cepas de *E. coli* y *S. aureus* en medio de caseína con adición de piocianina. En la figura 49 se muestran los resultados obtenidos. Podemos observar que el crecimiento en este medio de cultivo al adicionar piocianina, fue menor al que se obtuvo en el cultivo sin la adición de este factor, por lo que sugiere que las células disminuyeron en ambos cultivos (*E. coli* y *S. aureus*) por actividad de la piocianina, a pesar de su disminuido crecimiento *per se* en este medio.

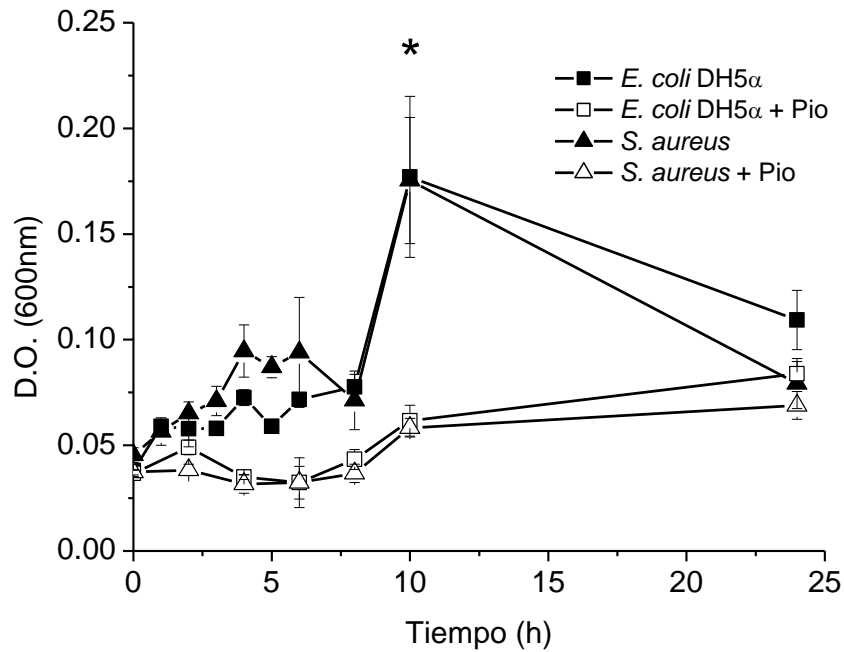


Figura 49 Curvas de crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* en medio de caseína 0.5% sin piocianina agregada (rellenos) y adicionados con piocianina (pio) (50 μ M) (huecos), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, n=7-9; *Mann-Whitney $p < 0.05$).

Estas dos cepas (*E. coli* y *S. aureus*) demostraron un comportamiento similar al que presentaba $\Delta lasR \Delta rhIR$, es decir, no crecen en el medio de caseína ya que carecen de la producción de exoproteasas que degraden la caseína, en el medio con adición de proteasa son capaces de utilizar los productos de la degradación de caseína para sustentar su crecimiento y en el medio de caseína con adición de piocianina presentan una disminución en su crecimiento sugiriendo ser sensibles a este compuesto (Tabla 10). A pesar de esto en las competencias con la cepa WT (PA14K), no fueron capaces de generar el aumento de su proporción inicial a lo largo del tiempo sino todo lo contrario ya que a las 4 h de cultivo en la mayoría de los casos ya no estaban presentes, sugiriendo que estas dos cepas son muy sensibles a los factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa*. Sin embargo, su presencia no pasó desapercibida ya que en todas las competencias se observó una afectación en la producción de los factores de virulencia especialmente de elastasa y proteasa alcalina, es decir, en los factores regulados por el sistema de quórum Las pero no por el sistema Rhl porque la producción de piocianina se mantuvo en cantidades similares en las dos competencias comparándolas con la producción obtenida en los cultivos WT (PA14K). Estos resultados sugieren que tanto *E. coli* como *S. aureus* poseen moléculas que afectan directamente el sistema de quórum Las sin afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* (Tabla 11 y 12).

Cepa/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
$\Delta lasR \Delta rhIR$	0.89 ± 0.02	0.78 ± 0.02
<i>E. coli</i> (DH5 α)	0.54 ± 0.01	1.27 ± 0.03
<i>S. aureus</i>	0.42 ± 0.005	1.64 ± 0.02

Tabla 10 Parámetros determinados de cultivos de las cepas $\Delta lasR \Delta rhIR$, *E. coli* (DH5 α) y *S. aureus* cultivadas en medio de caseína adicionado con 0.98 u/ml de proteasa por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).

Cultivo/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
PA14K	$0.34 \pm 0.02^*$	$2.14 \pm 0.1^*$
10% DH5 α	$0.2 \pm 0.02^*$	$4.26 \pm 0.64^*$
50% DH5 α	$0.24 \pm 0.03^*$	$3.57 \pm 0.42^*$
90% DH5 α	$0.21 \pm 0.01^*$	$3.76 \pm 0.42^*$
<i>E. coli</i> (DH5 α)	$0.12 \pm 0.01^*$	$6.25 \pm 0.67^*$

Tabla 11 Parámetros determinados de las competencias entre PA14K y *E. coli* (DH5 α) cultivadas en medio de caseína por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).

Cultivo/ Parámetro	Velocidad de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
PA14K	$0.34 \pm 0.02^*$	$2.14 \pm 0.1^*$
10% <i>S. aureus</i>	$0.22 \pm 0.05^*$	$3.91 \pm 0.83^*$
50% <i>S. aureus</i>	$0.15 \pm 0.03^*$	$5.44 \pm 0.91^*$
90% <i>S. aureus</i>	$0.12 \pm 0.01^*$	$5.97 \pm 0.63^*$
<i>S. aureus</i>	$0.11 \pm 0.02^*$	$7.11 \pm 1.18^*$

Tabla 12 Parámetros determinados de las competencias entre PA14K y *S. aureus* cultivadas en medio de caseína por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).

8.6. Efecto de la pirocianina sobre *A. baumannii* con sistema de quórum activo e inactivo.

También se hicieron otros experimentos con otra especie bacteriana, para ver el efecto de la pirocianina en la selección de individuos con sistema de quórum activo, frente a individuos sin sistema de quórum.

Acinetobacter baumannii es un patógeno oportunista, con una amplia resistencia a antibióticos (Dijkshoorn et al., 2007) y al igual que *P. aeruginosa*, cuenta con un sistema de *quorum sensing* tipo Lux (Castillo-Juarez et al., 2017). En esta bacteria el autoinductor N-(3-hidroxidodecanoil)-L-homoserín lactona es sintetizado a partir de la enzima transcrita del gen sintasa *abaI* y su receptor es AbaR, su activación está relacionado directamente con la capacidad para la formación de biopelícula

(Dijkshoorn et al., 2007; Bhargava et al., 2014; Qi et al., 2016; López et al., 2017). Para estos experimentos se ocuparon la bacteria *A. baumannii*, con quórum (ATCC 17978, WT) y una mutante de la sintasa del autoinductor ($\Delta abal$). En este experimento se cultivaron las dos cepas por separado en LB y cuando llegaron a una densidad óptica de 2 (600 nm), se hicieron mezclas de 50% de las dos cepas, con o sin exposición a piocianina (50 μ M), por un intervalo de tiempo de 20 min. Se tomaron muestras para calcular la proporción de cada población al inicio de la competencia y al final. Como en este caso no se diferenciaban por algún fenotipo en especial como la degradación de caseína, se ocupó la determinación por PCR para identificar cada colonia, utilizando el gen *abal* como identificación de la cepa WT y el gen *pbpC* como control positivo (Figura 51). El gen *pbpC* codifica para una proteína de unión a penicilina presente en las dos poblaciones.

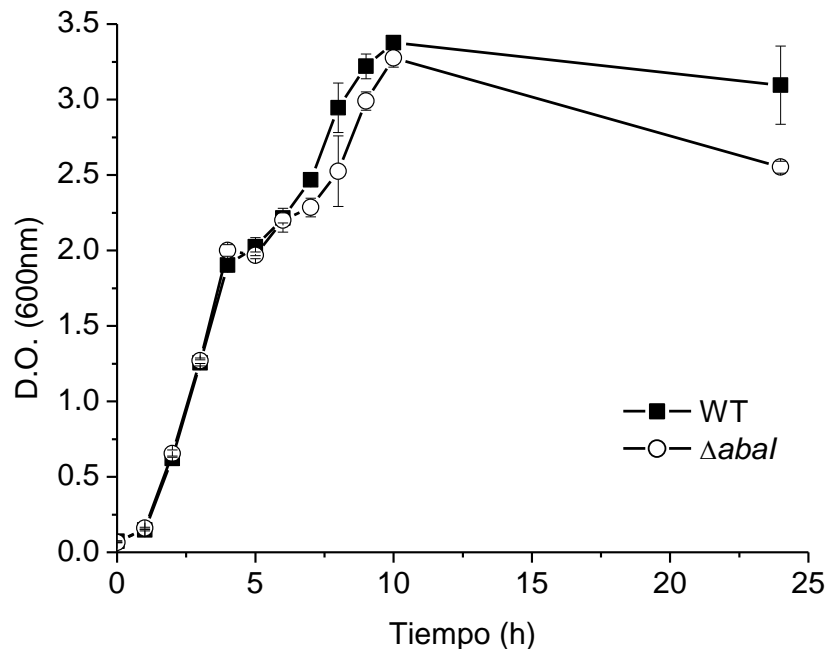


Figura 50 Curva de crecimiento de *A. baumannii* WT y su mutante $\Delta abal$ en medio LB, incubado a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, n=4).

Se realizó una curva de crecimiento de estas dos cepas en medio LB, esto como un control para observar si la mutación ($\Delta abal$) afectaba su crecimiento y también para observar si su crecimiento no sugería algún fenómeno diferente a los que se habían observado en los anteriores experimentos (Figura 25). En la figura 50 se puede observar la curva de crecimiento y podemos notar que no hay una diferencia en el crecimiento de estas dos cepas, por lo tanto, esto sugiere que esta mutante no tiene deficiencias en su crecimiento y también que no es capaz de mostrar un comportamiento oportunista en este medio de cultivo tal y como se observó en los cultivos de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y $K\Delta phzM$, cuando se cultivaron en el medio de casaminoácidos y LB (Figura 25C y D).

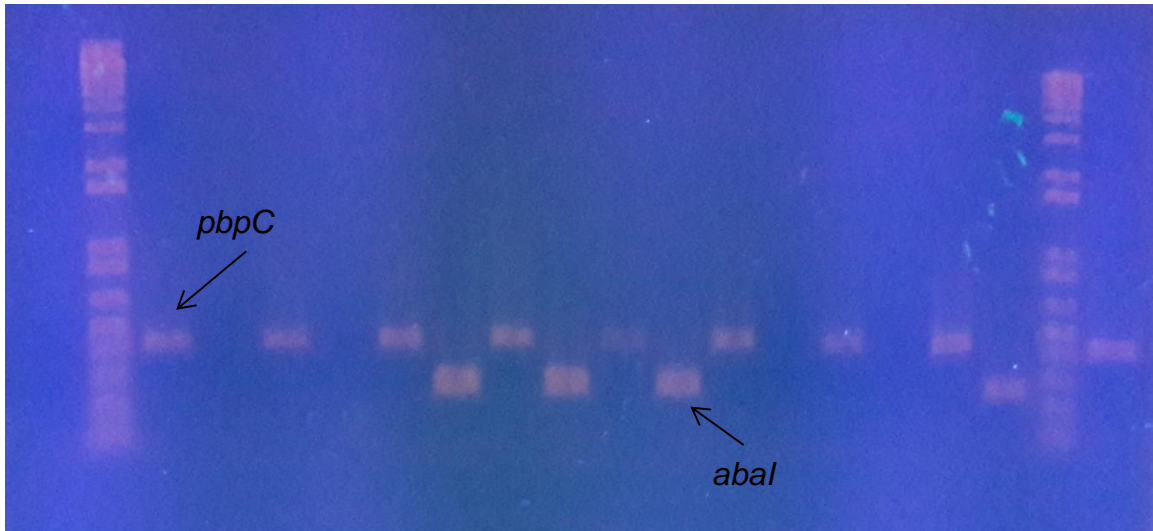


Figura 51 Electroforesis en gel de agarosa 1%, PCR de *A. baumannii* WT y $\Delta abal$, con los genes *abal* (255pb) y *pbpC* (419pb), n=140.

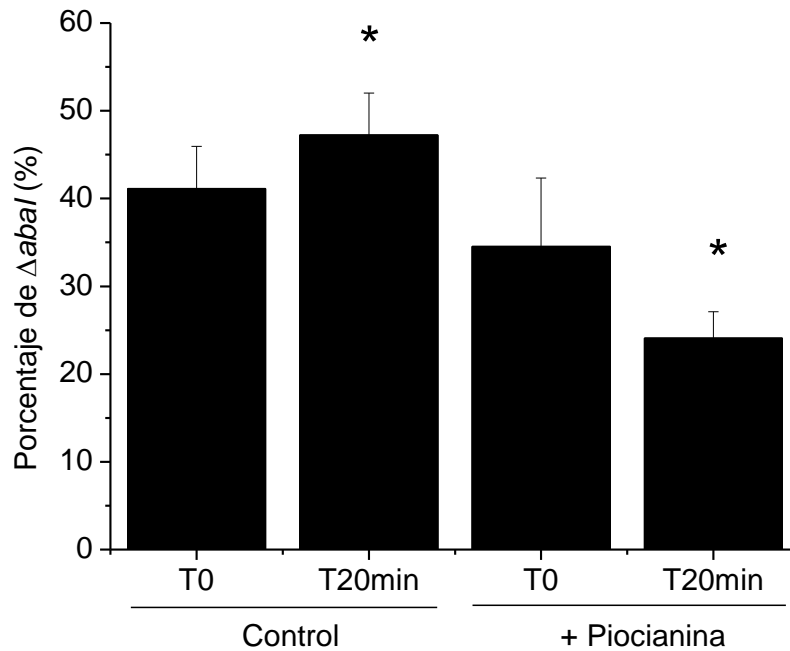


Figura 52 Porcentaje de *A. baumannii* $\Delta abal$ en competencias con WT y $\Delta abal$ en medio LB sin (control) y con presencia de piocianina (50 μM), iniciadas con 50% de cada cepa, incubadas a 37°C y 200 rpm por 20 min, (Promedio \pm error típico, n=140; *Mann-Whitney $p < 0.05$).

La figura 51 muestra un ejemplo de la identificación de las cepas, estas se colocaron en pares, es decir, que la primera banda muestra la amplificación del gen *abal* y la siguiente la amplificación de *pbpC* de la misma colonia aislada.

En la figura 52 se muestran los resultados obtenidos y se puede ver que en la competencia sin presencia de pirocianina, la proporción de bacterias se mantiene similar a la proporción calculada al inicio del cultivo, mientras tanto, en el cultivo que se expuso a pirocianina se nota una reducción en el porcentaje de mutantes *Δabal* a casi 30% (29.3%), disminuyendo un 18% la proporción mutante con respecto al experimento sin pirocianina, esto sugiere que la pirocianina tiene un efecto negativo también sobre poblaciones sin quórum en otras especies como lo es *A. baumannii*.

9. DISCUSIÓN

El cultivo WT (PA14K) en caseína es la mejor condición de crecimiento, ya que genera la mayor concentración celular y de factores de virulencia medidos. Como es evidente y ya fue antes mencionado, el crecimiento en este medio de cultivo depende de la presencia de la cepa WT, ya que en el cultivo puro con mutantes no crecen. Todo esto con base en los exoproductos, pero más específicamente de la proteasa alcalina, ya que la elastasa aunque se ha demostrado es capaz de degradar la caseína (Caballero et al., 2001) en estos experimentos no muestra esa capacidad y de hecho se ve un claro ejemplo en los cultivos de *S. aureus* en caseína, donde presenta incluso una mayor cantidad de elastasa que los cultivos de PA14K, pero no es capaz de generar nutrientes a partir de la degradación de caseína para el crecimiento de esta cepa.

La sobreproducción de la proteasa alcalina tiene dos posibles explicaciones, la primera se basa en la estimulación de los sistemas de quórum, es decir, las células mutantes carecen de los genes que codifican para los receptores efectoros, los encargados de la activación de los sistemas de quórum de los sistemas Las y Rhl, pero no de los genes que sintetizan los autoinductores por lo que son capaces de generar estas señales, aunque posiblemente en menor cantidad que las células WT, debido a que se sabe que estos sistemas tienen un mecanismo de retroalimentación generado por la unión de receptor y el autoinductor provocando transcripción de la sintasa del autoinductor. Esta producción de autoinductores por parte de las células mutantes podría estar estimulando la producción de factores de virulencia en las células WT, pero si esto fuera lo que estuviera pasando, no solo se vería afectada la producción de proteasa sino también de otros factores de virulencia regulados por estos sistemas, sin embargo, la producción de elastasa, un factor de virulencia que también está regulado por este sistema (Las), no se ve afectado por lo que esta explicación no respondería del todo lo que se observó en este experimento. La segunda explicación sería que este fenómeno ocurre debido a la disminución de los nutrientes percibida por las células WT, este fenómeno también ocurre con otros factores de virulencia como los sideróforos que sirven para la captación de hierro, ya que se ha observado que en un medio de cultivo con bajas concentraciones de hierro, se estimula la producción de sideróforos para una mejor captación (Buckling et al., 2007). En este caso las células WT tienen una baja percepción de los nutrientes, porque estos están siendo ocupados por los oportunistas, generando así una deficiencia de nutrientes que las células intentan mitigar con el aumento de las proteasas, las cuales generarían de nuevo nutrientes, provocando una sobreproducción. Este fenómeno también se ve en las competencias con la cepa sin piocianina pero a un menor nivel, ya que esta cepa produce aparentemente una menor cantidad de proteasa que la cepa WT. Sin embargo, en las competencias con estas dos cepas se hace evidente que la producción de proteasa es suficiente para sostener el crecimiento tanto de la población WT (con y sin piocianina) como de los *cheaters* ($\Delta lasR \Delta rhlR$), ya que hasta los cultivos de 90% muestran un aumento en la población registrada por el

aumento en la densidad óptica con respecto a los cultivos de $\Delta lasR \Delta rhIR$, que supera por casi tres veces la densidad alcanzada solo por la población mutante en las dos competencias (Figura 26). Sandoz y colaboradores (Sandoz et al., 2007) demostraron que la transcripción de varios factores de virulencia como *aprA* (proteasa alcalina), *lasB* (elastasa) y *rhIA* (ramnosiltransferasa) está aumentada en este medio de cultivo y que precisamente es esta transcripción lo que provoca la invasión de mutantes $\Delta lasR$ durante el crecimiento, generando una ventaja selectiva. El aumento en la transcripción de estos genes solo se presentó en este medio de cultivo ya que en el medio de casaminoácidos, la producción de estos exoproductos está disminuida generando una expresión a bajos niveles provocando que los mutantes $\Delta lasR$ no puedan enriquecerse.

Por otra parte, la producción de piocianina no está ligada a la obtención de energía como en el caso de la síntesis de proteasa, además que su síntesis está activada por un sistema de quórum diferente (Rhl). Al analizar los resultados de la producción de piocianina podemos observar que todos los resultados son diferentes significativamente con respecto al cultivo de $\Delta lasR \Delta rhIR$ (Tabla 6), esto tiene sentido ya que este cultivo es el único donde no hay presencia de células productoras. Sin embargo, lo que parece importante hacer notar es que en la figura 25C, donde se muestra que la síntesis de este pigmento, alcanza su mayor producción entre las 6 y 8 h en el cultivo WT, podría tener relación con la disminución en el aumento de *cheaters* en las competencias de 10 y 50%.

La adición de piocianina a la competencia iniciada con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ y 90% de $K\Delta phzM$, no generó una disminución significativa en el crecimiento, sin embargo, cuando se le adicionó solo agua, su crecimiento final sí es estadísticamente diferente con respecto al crecimiento de la condición control (10%), esto puede ser explicado por dos posibles situaciones. Es probable que haya ocurrido por una dilución de los factores de virulencia (proteasas), pero en los cultivos con adición de piocianina no muestran esta situación debido a que posiblemente en el stock de piocianina se le hayan agregado proteasas que pudieran haber estado presentes al momento de la extracción. Recordemos que este stock se hizo a partir de la extracción de piocianina de un cultivo de PA14K en caseína a las 24 h por lo que todos los factores de virulencia generados por esta cepa, incluidos estos compuestos, pudieron estar presentes y ser extraídos en concentraciones bajas sin intención (estos compuestos no se cuantificaron en el stock), lo que disminuyó el efecto de dilución observado cuando se adicionó agua; aunque las probabilidades de que ocurriera esto son muy bajas porque el método utilizado para la extracción no propicia las mejores condiciones para que estos factores siguieran siendo funcionales en el stock. La otra posible situación que provocó esta disminución en el crecimiento pudo haberse dado por un choque osmótico, generado por la adición de agua que en el caso de la adición de piocianina no se observó, probablemente porque el stock contaba con una parecida osmolaridad al cultivo. Por lo que tal vez el choque osmótico es una mejor explicación a lo que sucedió, ya que al disminuir el crecimiento del cultivo pero no la velocidad, sugiere que se afectó a la población tanto mutante como WT, debido a que también las proporciones finales entre el cultivo control y el cultivo

con adición de agua no muestran diferencias significativas, y que en caso de haber afectado solo a la población mutante esta proporción posiblemente hubiera resultado menor y el crecimiento hubiera alcanzado la misma densidad óptica que el control.

Después de comprobar que la piocianina era la que ejercía un efecto negativo sobre la población oportunista, se realizó un experimento en anaerobiosis para determinar si la reducción de la piocianina con ayuda del oxígeno y del NAD(P)H era la causante de este efecto, ya que este proceso es el responsable de la formación de especies reactivas de oxígeno (O'Malley, 2004; Das et al., 2016; Hall et al., 2016). La presencia de ROS y la generación de un ambiente oxidativo, es probablemente el mecanismo de acción por el cual la piocianina detiene el aumento de las células oportunistas, debido a que estas son más sensibles a su acción por presentar una disminución en la activación de enzimas antioxidantes, las cuales son dependientes de quórum y también por la deficiencia en la conformación de la membrana celular, que contiene menor cantidad de ácidos grasos lo que la hace menos resistente a estreses oxidantes con respecto a las células WT (Hassett et al., 1999; Sabra et al., 2002; Davenport et al., 2015; García-Contreras et al., 2015).

La piocianina es un agente redox, capaz de reducirse y oxidarse con ayuda de peroxidasa, cuando se encuentra en infecciones o en presencia de NAD(P)H intracelular de forma *in vitro*, siendo este último el donador de electrones en condiciones de aerobiosis convierte el oxígeno en el ion superóxido y peróxido de hidrógeno. El ion superóxido a su vez es transformado por la enzima superóxido dismutasa a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es transformado a oxígeno molecular y agua, por acción de la enzima catalasa (Hassett et al., 1989, 1999, 2011; El-Fouly et al., 2015; García-Contreras et al., 2015) (Figura 53). Los genes que codifican para estas dos enzimas, se encuentran entre los genes que son controlados por los sistemas de quórum, por lo que su transcripción depende de su activación y también a partir de la presencia de sus sustratos que activan la respuesta contra estrés oxidativo por parte de *oxyR* y *rpoS* (Hassett et al., 1999; Schuster et al., 2006; Choi et al., 2007; Arai, 2011). Con base en esto al eliminar la presencia de oxígeno se intentó disminuir y eliminar la generación de ROS por este proceso. Como se explicó anteriormente, esta bacteria tiene la capacidad de crecer en anaerobiosis utilizando nitratos o arginina como últimos aceptores de electrones en remplazo del oxígeno. En este experimento se ocupó una fuente de nitratos para sustituir al oxígeno, ya que esta vía es más eficiente para la obtención de energía que la fermentación de arginina (Benkert et al., 2008). La respuesta por parte de la bacteria a la ausencia de oxígeno y a la presencia de nitritos o nitratos, es la inducción de enzimas desnitrificantes, esto debido a la activación del quórum y también a dos reguladores transcripcionales Anr y Dnr, que son requeridos para la completa expresión de todos los genes desnitrificantes (Schreiber et al., 2007; Arai, 2011).

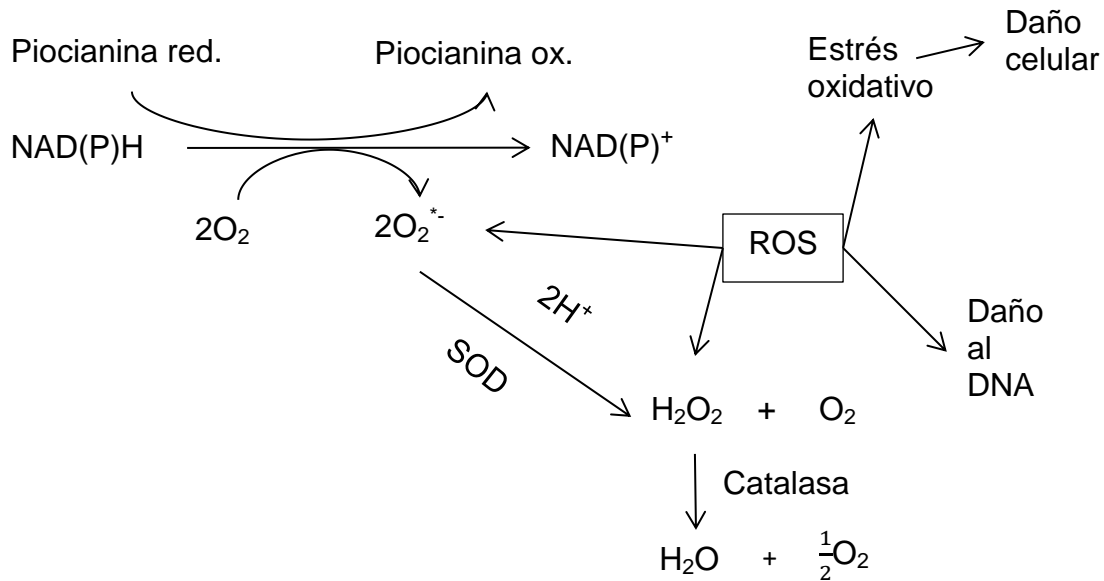


Figura 53 Diagrama de la posible generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) por reducción de piocianina. Abreviaturas: Red reducida, Ox oxidada, SOD superóxido dismutasa.

La piocianina afecta selectivamente a los individuos sin quórum debido a la formación de especies reactivas de oxígeno en competencias, por lo que se realizaron experimentos para ver si este factor de virulencia limitaba también la aparición de oportunistas en cultivos WT. Estos experimentos se hicieron con las dos cepas WT (con y sin producción de piocianina) y se observó que los cultivos con adición de piocianina aunque no varía el tiempo de aparición de las *cheaters*, sí disminuye la cantidad de *cheaters* que aparecen. Sin embargo, se puede observar otro fenómeno muy interesante, la aparición de mutantes sin proteasa es mayor cuando hay síntesis de piocianina por parte de la población WT, mientras que cuando no existe esta producción de manera natural (*KΔphzM*), la aparición de estas mutantes es mucho menor. Una posible explicación sería que en los cultivos donde se sintetiza piocianina el control sobre la aparición de *cheaters* es un poco menos restringido, porque al tener la capacidad de sintetizar este factor y otros factores de virulencia que se han demostrado tienen un control sobre esta población, en el caso del surgimiento de oportunistas se podría ejercer la limitación y disminución de los *cheaters* más rápido solo aumentando la síntesis de estos factores, mientras que en los cultivos donde no se produce un factor, en este caso la piocianina es probable que se tenga un control más eficiente sobre la aparición de los oportunistas.

Las interacciones de *P. aeruginosa* y otras especies pueden presentarse en ambientes naturales e incluso en infecciones. Estas interacciones pueden darse por el reconocimiento de autoinductores o la utilización de moléculas señalizadoras (metabolitos secundarios) y están relacionadas en su mayoría con la competencia por fuentes de energía y cofactores necesarios para su

metabolismo (Diggle et al., 2007). Con base en esto, en este trabajo también se llevaron a cabo competencias con otras especies, para observar si la piocianina tiene un efecto sobre ellas similar al que ejerce sobre las mutantes sin quórum de su misma especie. Para este caso se utilizaron dos bacterias (*E. coli* y *S. aureus*) que se han observado son capaces de crecer en conjunto con *P. aeruginosa*. En previos trabajos se demostró que tanto *S. aureus* como *E. coli* son capaces de utilizar bienes públicos producidos por *P. aeruginosa* para su supervivencia en medios donde es necesaria la presencia de estos para el crecimiento. Por ejemplo, Buckling y colaboradores (Buckling et al., 2007) observaron que en competencias de *S. aureus* y *P. aeruginosa* por la obtención de hierro, *S. aureus* es capaz de utilizar los sideróforos sintetizados por *P. aeruginosa*. Mientras tanto, Kay y colaboradores demostraron que los cultivos mixtos de *P. aeruginosa* y *E. coli* son menos sensibles a la acción de bacteriófagos al generar en conjunto, una biopelícula más resistente que cuando son cultivadas de forma individual (Kay et al., 2011).

S. aureus cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia como PVL (paton valentine leucocidina), H1 α (alfa toxina heptamerica), modulinas solubles en fenol (PSM, phenol-soluble modulins), proteínas ancladas a la pared (CWA, cell wall-anchored proteins) como SasX presentes en *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), proteína A (SpA), proteínas con unión a fibronectina (FnBPs), factor de agrupamiento A y B (C1fA, cumpling factor A or B) (Rutherford et al., 2012). La función de estos factores de virulencia se ha estudiado en infecciones en mamíferos y en su mayoría contribuyen a la agregación y la formación de poros en las membranas celulares para posteriormente provocar necrosis y muerte celular (Lacey et al., 2016). Sin embargo, su efecto contra *P. aeruginosa* no ha sido ampliamente estudiado, aunque sí se ha observado que en infecciones estas dos especies pueden coexistir, debido a un posible secuestro de los autoinductores de *P. aeruginosa* por parte de moléculas como la albúmina sérica presente en los huéspedes lo que impide que la comunicación celular se lleve a cabo y por lo tanto, que los sistemas de quórum se activen para producir los factores de virulencia responsables de la respuesta en contra de *S. aureus* (Smith et al., 2017).

También *E. coli* cuenta con muchos factores de virulencia como: adhesinas, proteínas membranales, hemolisinas y una gran cantidad de toxinas (Mainil, 2013), aunque la cepa utilizada en este proyecto (DH5 α) se ocupa por su capacidad de transformación y también en algunos casos como un control negativo de virulencia (Mahajan-Miklos et al., 1999). Pero en estos experimentos al compararla con *S. aureus* presenta un efecto negativo mayor sobre el crecimiento del cultivo, sobretodo en la competencia iniciada con 90% donde se observó que a lo largo de la curva, el crecimiento es menor que en todas las competencias entre PA14K y otra especie. Uno de los metabolitos secundarios más estudiados en *E. coli* debido a su efecto negativo sobre *P. aeruginosa* es el indol, que se ha demostrado es capaz de inhibir la percepción del quórum y por lo tanto, la producción de sus factores de virulencia sin afectar su crecimiento (Chu et al., 2012). Cabe mencionar que uno de los factores de virulencia más afectados es en *P. aeruginosa* es la piocianina (Lee et al., 2009, 2011), aunque en el caso

de los cultivos en medio de caseína no se observó este efecto, debido a *E. coli* fue eliminada del cultivo antes de llegar a la fase estacionaria que es cuando más producción de indol presenta esta cepa; pero si se pudo observar el efecto de la disminución en el crecimiento en este medio. Por otro lado, en las placas de LB-leche, donde se aislaron las cepas para determinar su porcentaje en el cultivo (Figura 46A), sí se pudo observar la disminución de la piocianina, debido a que si fue capaz de llegar a la fase estacionaria (Lee et al., 2007).

Conocer todas las interacciones entre varios microorganismos es muy complicado ya que cada uno cuenta con una gran cantidad de moléculas que puede tener efecto en el otro y este a su vez puede ser sobrelapado con otro, por lo que su percepción también podría estar alterada.

Con respecto a la producción de piocianina en estas dos competencias (*E. coli* y *S. aureus*), se observó un comportamiento parecido y también un posible efecto similar, ya que la eliminación de las dos cepas en el cultivo ocurre casi al mismo tiempo, por lo tanto, podrían tener una relación; el efecto de la piocianina sobre estas dos cepas ya se ha demostrado y se ha observado una marcada sensibilidad a la presencia de esta. Hassan y colaboradores (Hassan et al., 1980) confirmaron que *E. coli* disminuye y detiene su crecimiento en presencia de 50 μM de piocianina, debido a la sensibilidad de esta cepa a la formación de ROS, aun cuando la piocianina estimula también una respuesta en contra del estrés oxidativo con la síntesis de enzimas que lo combaten como catalasa (2 isoformas) y superóxido dismutasa (3 isoformas) sin tener éxito; además de este efecto la piocianina también es capaz de generar cierta protección en esta cepa en contra de la acción del cianuro, es decir, que en presencia de piocianina disminuye la inhibición de la respiración celular generada por el cianuro, esto sugiere que la producción de cianuro por parte de *P. aeruginosa* posiblemente no afecta la viabilidad de la bacteria y que el efecto observado es solamente por acción de la piocianina.

Otros estudios han comprobado también el efecto negativo de *P. aeruginosa* sobre el crecimiento de *S. aureus*, ya que se ha observado que en competencias con células WT (PA14K), *S. aureus* muestra una disminución en su población de aproximadamente 75% similar a lo que se observó en los experimentos realizados, mientras que en competencias con mutantes sin el sistema de quórum Las, disminuyen la presencia de *S. aureus* entre un 45 y 65 % del cultivo y así mismo en competencias con mutantes sin los dos sistemas de quórum (Las y Rhl) no tienen efecto sobre esta población, confirmando que el efecto negativo en la población de *S. aureus* está provocado por los productos de la activación del sistema de quórum Rhl, aunque este trabajo no confirma que el efecto es debido a la presencia específica de piocianina (Dekimpe et al., 2009). En otros trabajos sí se ha demostrado que el efecto es generado por la presencia de piocianina, ya que al someter cultivos puros de *S. aureus* a una concentración de 100 μM de piocianina por 24 h disminuye su crecimiento casi en su totalidad (Costa et al., 2015), confirmando la sensibilidad de *S. aureus* a la piocianina.

Con base en todo esto las cepas WT (con y sin producción de piocianina) también debería ser sensible a la acción de la piocianina, pero en varios trabajos de investigación han comprobado que la presencia de piocianina tiene un leve efecto en esta cepa y eso se debe en parte a que su síntesis está controlada por los sistemas de quórum, lo que le da una ventaja sobre los otros microorganismos ya que a la vez que se está sintetizando la piocianina también se están sintetizando las enzimas que contrarresten su efecto como lo son las diferentes isoformas de catalasas y de superóxido dismutas, además de la conformación de membrana celular más resistente. Otra característica que le ayuda a resistir el efecto de este compuesto es que no es capaz de ingresar a la célula, habilidad que no poseen los organismos sensibles como *E. coli* y *S. aureus*, de este modo al no permitir el ingreso de la piocianina a la célula limita la generación de especies reactivas de oxígeno en el interior de la célula mientras la actividad extracelular es contrarrestada en su mayoría por la acción de la catalasa, debido a que esta aumenta un 62% en cultivo de *P. aeruginosa* adicionada con piocianina.

Cepa	Condiciones	D.O. (600 nm)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (h)
PA14K	Caseína	1.85 ± 0.09*	0.34 ± 0.02*	2.14 ± 0.1*
	Caseína + Piocianina (50µM)	1.14 ± 0.11*	0.54 ± 0.05*	1.31 ± 0.11*
<i>KΔphzM</i>	Caseína	1.13 ± 0.1*	0.30 ± 0.02	2.35 ± 0.16
	Caseína + Piocianina (50µM)	0.54 ± 0.04*	0.42 ± 0.06	1.76 ± 0.19
<i>ΔlasR ΔrhIR</i>	Caseína	0.2 ± 0.05*	0.11 ± 0.02*	7.45 ± 1.70*
	Caseína + Piocianina (50µM)	0.04 ± 0.03*	0.09 ± 0.02*	10.45 ± 2.33*
<i>E. coli</i> DH5α	Caseína	0.079 ± 0.01*	0.12 ± 0.01*	6.25 ± 0.67*
	Caseína + Piocianina (50µM)	0.051 ± 0.003*	0.03 ± 0.01*	27.03 ± 5.87*
<i>S. aureus</i>	Caseína	0.11 ± 0.01*	0.11 ± 0.02*	7.11 ± 1.18*
	Caseína + Piocianina (50µM)	0.07 ± 0.003*	0.03 ± 0.01*	39.72 ± 15.88*

Tabla 13 Parámetros determinados de cultivos de las cepas PA14K, *KΔphzM*, *ΔlasR ΔrhIR*, *E. coli* (DH5α) y *S. aureus* cultivadas en medio de caseína solo y adicionado con 50µM de piocianina por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio ± error típico, n=3-33, *Mann-Whitney p < 0.05).

Con los experimentos realizados se comprobó que la piocianina es un compuesto con la capacidad de controlar a la población oportunista en los casos de las competencias con la mutante sin quórum y también contribuye a evitar la propagación y elimina del cultivo a diferentes especies en los casos de las competencias con *E. coli* y *S. aureus* (Tabla13). Con base en esto se decidió evaluar si este compuesto podía estar involucrado en una selección específica entre individuos con sistema de quórum funcional sobre individuos sin quórum en otras especies, por lo que se realizaron experimentos con otro microorganismo. Se utilizó *A. baumannii* y su mutante sin quórum para observar si esto era posible y se comprobó que la piocianina afecta negativamente la proporción específica de la mutante sin quórum en cultivos mixtos, ya que en la figura 52 se puede observar

como disminuye significativamente esta población en presencia de piocianina. Trabajos previos han evaluado esta situación y la razón por la que ocurre esta selección tiene el mismo fundamento que la selección observada en las competencias de PA14K y su doble mutante $\Delta lasR \Delta rhIR$. Al igual que la mutante de *P. aeruginosa* sin quórum, $\Delta abal$ muestra una respuesta deficiente al estrés oxidativo generado por la formación de ROS como resultado de la reducción de piocianina con NAD(P)H y oxígeno aún sin el estímulo generado por la presencia de piocianina, ya que no genera una producción adecuada de enzimas antioxidantes como catalasa y SOD frente a estímulos como el ácido salicílico y la adición de autoinductores, cosa que si ocurren en la cepa WT. Por lo tanto, estos resultados confirman la habilidad de la piocianina para la selección de individuos sin sistemas de quórum activos basándose en su desventaja frente al estrés oxidativo.

10. CONCLUSIONES

La producción de piocianina por parte de las células con sistemas de quórum activos, tiene la capacidad de controlar la población oportunista tanto para limitar su proliferación en cultivos mixtos como para disminuir su surgimiento en cultivos iniciados con células cooperadoras y el mecanismo genera esta selección es debido a la formación de especies reactivas de oxígeno, que pueden dañar DNA, proteínas y ácidos grasos.

Esta selección de población basados en los sistemas de quórum activos, no se limita a la especie de *P. aeruginosa*, sino que también se lleva a cabo en *A. baumannii*.

La piocianina también actúa como un agente bactericida en organismos como *E. coli* y *S. aureus*, eliminando su población en co-cultivos con *P. aeruginosa* después de 24 h de cultivo.

La producción de piocianina por parte de *P. aeruginosa* genera una protección contra del oportunismo y también contra de otras especies de microorganismos.

11. PERSPECTIVAS

Determinar las concentraciones de caseína a lo largo de los cultivos tanto mixtos como de forma individual, para comprobar el uso de esta como fuente de carbono y confirmar que el límite en el aumento de las células oportunistas ($\Delta lasR \Delta rhIR$) en los cultivos mixtos, es debido al efecto de la piocianina y no por la limitación de fuente de carbono.

Medir los niveles de autoinductores en los cultivos mixtos para correlacionarlos o no con el aumento de los factores de virulencia, así como medir la expresión de los genes, para observar la transcripción que confirme la sobreproducción de los factores de virulencia medidos.

Utilizar mutantes simples de los sistemas de quórum Las, Rhl y Pqs para observar su reacción frente al estrés biótico de la piocianina, y también mutantes de los genes que se cree se activan como respuesta a este estrés, como lo serían las enzimas que degradan las especies reactivas de oxígeno.

Iiyama y colaboradores mencionan que puede haber una posible conexión entre la proteasa alcalina (*aprA*) y la producción de piocianina, por lo que se podría utilizar una mutante de este factor de virulencia, para estudiar más a fondo el efecto entre estos dos compuestos (Iiyama et al., 2017).

Determinar la concentración de NAD(P)H en las células y comprobar si su interacción con la piocianina es la que fomenta su transformación a piocianina reactiva, la cual es la responsable de la formación de las especies reactivas de oxígeno (Hassett et al., 1992).

Medir las especies reactivas de oxígeno en cultivos puros y mixtos a lo largo del tiempo, para comprobar su actividad sobre las células con y sin sistemas de *quorum sensing* activos. También añadir moléculas antioxidantes para evaluar si pueden contrarrestar los efectos de las especies reactivas de oxígeno y determinar si estas muestran un efecto sobre las cepas.

12. ANEXO

12.1. Estreses externos que modifican la población en competencias entre individuos con *quorum sensing* activo y sin *quorum sensing*.

Paralelo a este trabajo se realizó un proyecto que con llevaba el uso de bacteriófagos, los cuales se consideraron factores externos que podrían alterar el equilibrio de poblaciones mixtas entre individuos con sistemas de quórum activo e inactivos. Por lo que se llevaron a cabo experimentos para comprobar si alguno de los bacteriófagos evaluados (D3112 y JBD30) tenía preferencia por infectar una cepa en específico y su efecto en cultivos mixtos *in vitro* e infecciones en el modelo *in vivo* *Galleria mellonella*.

A continuación se muestra el resumen presente en el trabajo de investigación y también se adjunta el artículo de la investigación publicado.

“La percepción de quórum (QS) en *Pseudomonas aeruginosa* coordina la expresión de los factores de virulencia, algunos de los cuales se utilizan como bienes públicos. Dado que su producción es un comportamiento cooperativo, es susceptible a las trampas sociales en las que las mutantes deficientes de QS no cooperadores utilizan los recursos sin invertir en su producción. Sin embargo, los individuos con los sistemas de QS funcionales son más abundantes; Por lo tanto, deben existir mecanismos que regulen la cantidad de trampas. La evidencia que demuestra una relación estrecha entre QS y la susceptibilidad de las bacterias contra el ataque de los bacteriófagos líticos está aumentando; sin embargo, la relación entre bacteriófagos templados y los sistemas de QS ha sido mucho menos explorada. Por lo tanto, en este trabajo, estudiamos los efectos de tener un sistema de QS funcional sobre la susceptibilidad a los bacteriófagos templados y como esto afecta la dinámica de las bacterias y los bacteriófagos. Encontramos que, tanto experimentalmente como utilizando modelos matemáticos, los bacteriófagos lisogénicos D3112 y JBD30 seleccionan fenotipos de *P. aeruginosa* con un sistemas de QS funcional en comparación con los mutantes con déficit en los sistemas de QS durante experimentos de competencias con poblaciones de cepas mixtas *in vitro* e *in vivo* en *Galleria mellonella*, a pesar del hecho de que ambos bacteriófagos se replican mejor en las bacterias de tipo salvaje. Mostramos que este fenómeno restringe el engaño social, y proponemos que los bacteriófagos templados pueden constituir una importante presión selectiva hacia la conservación de los sistemas de QS bacterianos” (Saucedo-Mora et al., 2017).

12.2. Índice de figuras

Figura 1 Esquema de los sistemas de quorum sensing en bacterias Gram A) negativas y B) positivas (Koh et al., 2013).	7
Figura 2 Esquema simplificado del sistema de percepción de quórum Lux. Modelo modificado de la regulación de la bioluminiscencia mediada por autoinductores en <i>Vibrio fischeri</i> (Lyell et al., 2010). Abreviatura: 3OC6 (N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C6HSL)), MI membrana interna, ME membrana externa.	8
Figura 3 Esquema simplificado del sistema de quórum Las en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Abreviatura: 3-oxo-C6HSL (N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona), MI membrana interna, ME membrana externa.	9
Figura 4 Esquema simplificado del sistema de quórum Rhl en <i>P. aeruginosa</i> . Abreviatura: C4-HSL N-butiril-homoserín lactona, MI membrana interna, ME membrana externa.	10
Figura 5 Esquema simplificado del sistema de quórum Pqs en <i>P. aeruginosa</i> . Abreviatura: 3OC6 (N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona (3-oxo-C6HSL)), C4-HSL N-butiril-homoserín lactona, PQS 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, HHQ 2-hetil-4(1H)-quinolona, MI membrana interna, ME membrana externa.	11
Figura 6 Localización genómica de los genes <i>phz</i> en <i>P. aeruginosa</i> (Dietrich et al., 2006).	19
Figura 7 Esquema propuesto para la formación de fenazinas en <i>P. aeruginosa</i> (Mavrodí et al., 2001 b). Abreviaturas: L-Gln Glutamina, ATP Adenosín trifosfato, AMP Adenosín monofosfato, PPI Pirofosfato inorgánico, PCN Fenazina-1-carboxamina, NADH/NAD ⁺ nicotinamida a denina dinucleótido y 1-OH-PHZ 1-hidroxifenazina.	20
Figura 8 Actividad enzimática de la proteasa tipo XI de <i>Streptomyces griseus</i> . A) Protocolo de proteasa alcalina y B) Protocolo de elastasa (n=1).	26
Figura 9 Producción de piocianina obtenida de un cultivo de PA14K en medio de caseína incubado por 24 h a 37°C y 200 rpm, utilizando los coeficientes de extinción molar 0.013µM-1cm-1 (388 nm) y 0.00246 µM-1cm-1 (520 nm) (Promedio ± error típico, n=3-6).	27
Figura 10 Modelo esquemático de la cadena regulatoria que controla los genes desnitrificantes en <i>P. aeruginosa</i> (Arai, 2011).	28
Figura 11 Curva de calibración de Piocianina a 388 nm.	31
Figura 12 Esquema de la metodología seguida en competencias con PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ o <i>E. coli</i> DH5 α o <i>S. aureus</i>	37
Figura 13 Esquema de la metodología seguida en competencias de $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$	38
Figura 14 Esquema de la metodología seguida en competencias con 90% de $K\Delta phzM$ y 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ con adición de piocianina.	39
Figura 15 Esquema de la metodología seguida en competencias de PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis.	40

Figura 16 Esquema de la metodología seguida para evaluar el efecto de la piocianina en la aparición de mutantes espontaneas deficientes de proteasa en cultivos de PA14K (WT) y $K\Delta phzM$.	41
Figura 17 Esquema de la metodología seguida para evaluar el efecto de la piocianina sobre células con o sin QS en competencias entre <i>A. baumannii</i> (WT) y $\Delta abal$.	42
Figura 18 Curvas de crecimiento de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, en medio de caseína 0.5% incubado a 37 °C y 200 rpm por 24 h. (Promedio \pm error típico, n=21-33, * Mann-Whitney, p<0.05)...	43
Figura 19 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de los cultivos de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, en medio de caseína 0.5% incubado a 37 °C y 200 rpm. (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=5-17, B) Proteasa alcalina n=12-33 y C) Piocianina n=5-13; * Mann-Whitney, p<0.05).	44
Figura 20 Fotografía de los cultivos de las competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, en medio de caseína 0.5% incubado a 37 °C y 200 rpm a las 24 h.	44
Figura 21 Apariencia de cepas PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en cajas con medio leche-LB y LB, flecha señala cepa PA14K con halo de hidrólisis de caseína, incubadas por 24 h a 37°C.	46
Figura 22 Electroforesis en gel de agarosa 1%, PCR de cepas PA14K (PA14) y $\Delta lasR \Delta rhIR$ (LR) con los genes <i>lasR</i> (706pb) y <i>rhIR</i> (675pb) para la determinación de las proporciones en las competencias entre estas cepas. Control negativo sin DNA (C-).	46
Figura 23 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en las competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, 10% n=12-21, 50% n=11-18 y 90% n=8-14; * χ^2 p<0.001).	47
Figura 24 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento, determinados de los cultivos de PA14K en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=3-17, B) Proteasa alcalina n=3-16 y C) Piocianina n=3-6).	49
Figura 25 Curvas de crecimiento de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y $K\Delta phzM$ en las diferentes condiciones evaluadas. A) medio de caseína 0.5%, B) medio de caseína 0.5% adicionado de 0.98 u/ ml de proteasa, C) medio de casaminoácidos, D) medio LB. Incubados a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, n=3-4; *Mann-Whitney p<0.05)	50
Figura 26 Curvas de crecimiento de $K\Delta phzM$, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).	52
Figura 27 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de las curvas de crecimiento de $K\Delta phzM$, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5% incubados a 37°C y 200 rpm, (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=3-33, B) Proteasa alcalina n=3-33 y C) Piocianina n=3-5; *Mann-Whitney p<0.05).	54

Figura 28 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en competencias entre $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, 10% n=3-18, 50% n=3-4 y 90% n=3-5; χ^2 p<0.001).....	55
Figura 29 Electroforesis en gel de agarosa 1%, PCR de cepas PA14K (PA14), $K\Delta phzM$ (K1) y $\Delta lasR \Delta rhIR$ (LR) con los genes <i>lasR</i> (706pb), <i>rhIR</i> (675pb) y <i>phzM</i> (234pb) para la determinación de las proporciones en las competencias entre estas cepas. Control negativo sin DNA (C-).....	55
Figura 30 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento, determinados de los cultivos de $K\Delta phzM$ en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, A) Elastasa n=3, B) Proteasa alcalina n=3-7 y C) Píocianina n=3).....	56
Figura 31 Comparación del porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en co-cultivo con PA14K (relleno) o $K\Delta phzM$ (hueco) (χ^2 p<0.001).....	57
Figura 32 Curvas de crecimiento de $K\Delta phzM$, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y las competencias iniciadas con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ adicionadas con 500 μ l de H ₂ O y 500 y 1000 μ l de píocianina (pio) a las 4 h de cultivo (flecha), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h; (Promedio \pm error típico, H ₂ O n=6-10, 500 μ l píocianina n=6-10 y 1000 μ l píocianina n=4).....	59
Figura 33 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en competencias entre $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína adicionados con H ₂ O, 500 μ l de píocianina y 1000 μ l de píocianina a las 4 h (flecha), iniciados con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, H ₂ O n=4-8, 500 μ l píocianina n=4-8 y 1000 μ l píocianina n=4; χ^2 p<0.001).....	59
Figura 34 Curvas de crecimiento de PA14K, $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5% sin píocianina agregada (rellenas) y con píocianina agregada (50 μ M) (huecas), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio \pm error típico, n=6-33; *, **, *** Mann-Whitney p<0.05).....	60
Figura 35 Curvas de crecimiento de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y las competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis en medio de caseína 0.5% adicionado con 40mM KNO ₃ , incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-4).....	62
Figura 36 Fotografía de los cultivos de PA14K, $\Delta lasR \Delta rhIR$ y las competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en anaerobiosis, en medio de caseína 0.5% adicionado con 40mM KNO ₃ , incubadas a 37 °C y 200 rpm a las 24 h.....	62
Figura 37 Porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ en medio de caseína 0.5% adicionado con KNO ₃ en anaerobiosis, iniciadas con 10, 50 y 90% de $\Delta lasR \Delta rhIR$, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio \pm error típico, n=3-4; *Mann-Whitney p<0.05).....	63
Figura 38 Comparación de porcentaje de $\Delta lasR \Delta rhIR$ en presencia (+ O ₂) y ausencia (- O ₂) de oxígeno en competencias con PA14K (Promedio error típico, n=3-18; χ^2 p<0.001).....	64
Figura 39 Porcentaje de células sin producción de proteasas determinadas en cultivos seriados de PA14K y $K\Delta phzM$ en medio de caseína 0.5% sin (rellena) y adicionado con 50 μ M de píocianina (pio) (huecas), sembradas cada 24 h a lo	

largo de 15 días, incubadas a 37°C y 200 rpm (Promedio ± error típico, n=3; *Mann-Whitney p<0.05).....	66
Figura 40 Crecimiento determinado cada 24 h a lo largo de 15 días de cultivos de PA14K y $\Delta phzM$ con presencia y ausencia de piocianina en medio de caseína 0.5%, incubados a 37°C y 200 rpm, (Promedio ± error típico, n=3).	67
Figura 41 Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 α y <i>S. aureus</i> en las diferentes condiciones evaluadas (medio de caseína 0.5% (rellena) y medio de caseína 0.5% adicionado con 0.98 u/ ml de proteasa (prot) (huecas), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio ± error típico, n=3-7; *, **Mann-Whitney p<0.05).	68
Figura 42 Curvas de crecimiento de PA14K y <i>E. coli</i> DH5 α (DH5 α) y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de <i>E. coli</i> DH5 α , en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio ± error típico, n=3-32; *Mann-Whitney p<0.05).	69
Figura 43 Curvas de crecimiento de PA14K, <i>S. aureus</i> y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de <i>S. aureus</i> , en medio de caseína 0.5%, incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio ± error típico, n=3-32; *Mann-Whitney p<0.05).	70
Figura 44 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de los cultivos de PA14K, <i>E. coli</i> DH5 α y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de <i>E. coli</i> DH5 α en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm, (Promedio ± error típico, A) Elastasa n=3-17, B) Proteasa alcalina n=3-16 y C) Piocianina n=3-7; *Mann-Whitney p<0.05).	71
Figura 45 Factores de virulencia normalizados por el crecimiento a las 24 h, determinados de los cultivos de PA14K, <i>S. aureus</i> y competencias iniciadas con 10, 50 y 90% de <i>S. aureus</i> en medio de caseína 0.5% incubadas a 37°C y 200 rpm, (Promedio ± error típico, A) Elastasa n=3-17, B) Proteasa alcalina n= 3-16 y C) Piocianina n=3-6; *Mann-Whitney p<0.05).	72
Figura 46 Apariencia de PA14K (ovalos), A) <i>E. coli</i> DH5 α (rectángulo) y B) <i>S. aureus</i> (rectángulo) en cajas con LB-leche, incubadas a 37°C por 24 h.....	73
Figura 47 Proporciones de <i>E. coli</i> DH5 α en competencias con PA14K y <i>E. coli</i> DH5 α en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de <i>E. coli</i> DH5 α , incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio ± error típico, 10% n=11-13, 50% n=3-19 y 90% n=10-22).....	73
Figura 48 Proporciones de <i>S. aureus</i> en competencias con PA14K y <i>S. aureus</i> en medio de caseína 0.5%, iniciadas con 10, 50 y 90% de <i>S. aureus</i> , incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h, (Promedio ± error típico, 10% n=4-5, 50% n=3-5 y 90% n=5).....	74
Figura 49 Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> en medio de caseína 0.5% sin piocianina agregada (reellenos) y adicionados con piocianina (pio) (50 μ M) (huecos), incubadas a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio ± error típico, n=7-9; *Mann-Whitney p<0.05).	75
Figura 50 Curva de crecimiento de <i>A. baumannii</i> WT y su mutante $\Delta abal$ en medio LB, incubado a 37°C y 200 rpm por 24 h (Promedio ± error típico, n=4).....	77
Figura 51 Electroforesis en gel de agarosa 1%, PCR de <i>A. baumannii</i> WT y $\Delta abal$, con los genes <i>abal</i> (255pb) y <i>pbpC</i> (419pb), n=140.	78
Figura 52 Porcentaje de <i>A. baumannii</i> $\Delta abal$ en competencias con WT y $\Delta abal$ en medio LB sin (control) y con presencia de piocianina (50 μ M), iniciadas con 50%	

de cada cepa, incubadas a 37°C y 200 rpm por 20 min, (Promedio ± error típico, n=140; *Mann-Whitney p<0.05)..... 78

Figura 53 Diagrama de la posible generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) por reducción de pirocianina. Abreviaturas: Red reducida, Ox oxidada, SOD superóxido dismutasa..... 83

12.3. Índice de tablas

Tabla 1 Datos de regresión lineal de la curva de calibración de Píocianina a 388nm.	31
Tabla 2 Primers o cebadores utilizados para realizar PCR.	32
Tabla 3 Valores de significancia de los análisis estadísticos realizados.	34
Tabla 4 Parámetros determinados de las competencias entre las cepas PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ cultivadas en medio de caseína 0.5% por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=5-33; $^{*1-2}$ Mann-Whitney p < 0.05).....	48
Tabla 5 Parámetros determinados de cultivos de las cepas PA14K, $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ cultivadas en medio de caseína 0.5% por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-32, *Mann-Whitney p < 0.05).....	51
Tabla 6 Parámetros determinados de cultivos de las cepas PA14K, $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ cultivadas en medio de caseína adicionada con 0.98u/ml de proteasa y medio de casaminoácidos por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-32; *1,2 Mann-Whitney p < 0.05).	51
Tabla 7 Parámetros determinados de las competencias entre las cepas $K\Delta phzM$ y $\Delta lasR \Delta rhIR$ cultivadas en medio de caseína por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p < 0.05).	53
Tabla 8 Parámetros determinados de las competencias iniciadas con 10% de $\Delta lasR \Delta rhIR$ y 90% de $K\Delta phzM$ y cultivadas por 24 h a 37°C y 200 rpm en medio de caseína adicionadas con H ₂ O, 500 μ l y 1000 μ l de piocianina a las 4 h de cultivo (Promedio \pm error típico, n=3-10; *Mann-Whitney p<0.05).....	60
Tabla 9 Parámetros determinados de las competencias entre PA14K y $\Delta lasR \Delta rhIR$ cultivadas en anaerobiosis en medio de caseína 0.5% por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=4; *Mann-Whitney p<0.05).....	65
Tabla 10 Parámetros determinados de cultivos de las cepas $\Delta lasR \Delta rhIR$, <i>E. coli</i> (DH5 α) y <i>S. aureus</i> cultivadas en medio de caseína adicionado con 0.98 u/ml de proteasa por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).	76
Tabla 11 Parámetros determinados de las competencias entre PA14K y <i>E. coli</i> (DH5 α) cultivadas en medio de caseína por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).	76
Tabla 12 Parámetros determinados de las competencias entre PA14K y <i>S. aureus</i> cultivadas en medio de caseína por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33; *Mann-Whitney p<0.05).....	76
Tabla 13 Parámetros determinados de cultivos de las cepas PA14K, $K\Delta phzM$, $\Delta lasR \Delta rhIR$, <i>E. coli</i> (DH5 α) y <i>S. aureus</i> cultivadas en medio de caseína solo y adicionado con 50 μ M de piocianina por 24 h a 37°C y 200 rpm (Promedio \pm error típico, n=3-33, *Mann-Whitney p < 0.05).....	86

13. BIBLIOGRAFIA

- Alayande, A. B.; Aung, M. M.; Kim, I. S., 2018: Correlation Between Quorum Sensing Signal Molecules and *Pseudomonas aeruginosa*'s Biofilm Development and Virulency. *Current Microbiology.*, **75**, 787–793.
- Arai, H., 2011: Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology.*, **2**, 1–13.
- Benkert, B.; Quäck, N.; Schreiber, K.; Jaensch, L.; Jahn, D.; Schobert, M., 2008: Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arcDABC operon. *Microbiology.*, **154**, 3053–3060.
- Bever, R. A.; Iglewski, B. H., 1988: Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *Journal of Bacteriology.*, **170**, 4309–4314.
- Bhargava, N.; Sharma, P.; Capalash, N., 2014: Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Immunity.*, **82**, 3417–3425.
- Bjorn, M. J.; Sokol, P. A.; Iglewski, B. H., 1979: Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Journal of Bacteriology.*, **138**, 193–200.
- Buckling, A.; Harrison, F.; Vos, M.; Brockhurst, M. A.; Gardner, A.; West, S. A.; Griffin, A., 2007: Siderophore-mediated cooperation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Ecology.*, **62**, 135–141.
- Budzik, J. M.; Rosche, W. a; Rietsch, A.; Toole, G. a O., 2004: Isolation and Characterization of a Generalized Transducing Phage for *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14 Isolation and Characterization of a Generalized Transducing Phage for *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14. *Society.*, **186**, 3270–3273.
- Caballero, A. R.; Moreau, J. M.; Engel, L. S.; Marquart, M. E.; Hill, J. M.; O'Callaghan, R. J., 2001: *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV Enzyme Assays and Comparison to Other *Pseudomonas* Proteases. *Analytical Biochemistry.*, **290**, 330–337.
- Camarena, L.; Bruno, V.; Euskirchen, G.; Poggio, S.; Snyder, M., 2010: Molecular Mechanisms of Ethanol-Induced Pathogenesis Revealed by RNA-Sequencing. *PLoS Pathogens.*, **6**, e1000834.
- Castillo-Juarez, I.; Lopez-Jacome, L. E.; Soberon-Chavez, G.; Tomas, M.; Lee, J.; Castaneda-Tamez, P.; Hernandez-Barragan, I. A.; Cruz-Muniz, M.; Maeda, T.; Wood, T. K.; Garcia-Contreras, R., 2017: Exploiting Quorum Sensing Inhibition for the Control of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Biofilms. *Current Topics in Medicinal Chemistry.*, **17**, 1915–1927.
- Castric, P., 1994: Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase. *Current Microbiology.*, **29**, 19–21.

- Cervantes-García, E.; García-González, R.; Reséndiz-Albor, A.; Salazar-Schettino, P. M., 2015: Infections of Diabetic Foot Ulcers With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The International Journal of Lower Extremity Wounds.*, **14**, 44–49.
- Cezairliyan, B.; Vinayavekhin, N.; Grenfell-Lee, D.; Yuen, G. J.; Saghatelian, A.; Ausubel, F. M., 2013: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines that Kill *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens.*, **9**.
- Chan, K. G.; Liu, Y. C.; Chang, C. Y., 2015: Inhibiting N-acyl-homoserine lactone synthesis and quenching *Pseudomonas* quinolone quorum sensing to attenuate virulence. *Frontiers in Microbiology.*, **6**, 1–7.
- Choi, Y. S.; Shin, D. H.; Chung, I. Y.; Kim, S. H.; Heo, Y. J.; Cho, Y. H., 2007: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes crucial for hydrogen peroxide resistance. *Journal of Microbiology and Biotechnology.*, **17**, 1344–1352.
- Chu, W.; Zere, T. R.; Weber, M. M.; Wood, T. K.; Whiteley, M.; Hidalgo-Romano, B.; Valenzuela, E.; McLean, R. J. C., 2012: Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Applied and Environmental Microbiology.*, **78**, 411–419.
- Costa, K. C.; Bergkessel, M.; Saunders, S.; Korch, J.; Newman, D. K., 2015: Enzymatic degradation of phenazines can generate energy and protect sensitive organisms from toxicity. *mBio.*, **6**, 1–10.
- Das, T.; Ibugo, A. I.; Klare, W.; Manefield, M., 2016: Role of Pyocyanin and Extracellular DNA in Facilitating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *INTECH*.
- Davenport, P. W.; Griffin, J. L.; Welch, M., 2015: Quorum sensing is accompanied by global metabolic changes in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.*, **197**, 2072–2082.
- Davies, D. G.; Parsek, M. R.; Pearson, J. P.; Iglewski, B. H.; Costerton, J. W.; Greenberg, E. P., 2007: The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm, **295**.
- Dekimpe, V.; Déziel, E., 2009: Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: The transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology.*, **155**, 712–723.
- Delden, C. Van; Iglewski, B. H., 1998: Cell-to-cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.*, **4**, 551–560.
- Dietrich, L. E. P.; Price-Whelan, A.; Petersen, A.; Whiteley, M.; Newman, D. K., 2006: The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology.*, **61**, 1308–1321.
- Diggle, S. P.; Griffin, A. S.; Campbell, G. S.; West, S. A., 2007: Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature.*, **450**, 411–414.
- Dijkshoorn, L.; Nemec, A.; Seifert, H., 2007: An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews*

- Microbiology.*, **5**, 939–951.
- Dubern, J. F.; Diggle, S. P., 2008: Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular BioSystems.*, **4**, 882.
 - El-Fouly, M. Z.; Sharaf, A. M.; Shahin, A. A. M.; El-Bialy, H. A.; Omara, A. M. A., 2015: Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences.*, **8**, 36–48.
 - Field, A., 2009: *Discovering Statistics Using SPSS with Windows*. SAGE. Third Edit. SAGE.
 - Filiatrault, M. J.; Picardo, K. F.; Ngai, H.; Passador, L.; Iglewski, B. H., 2006: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infection and Immunity.*, **74**, 4237–4245.
 - Filloux, A.; Ramos, J. L.; Walker, J. M., 2014: *Pseudomonas Methods and Protocols*. (Filloux, A. & J. L. Ramos, Eds.) Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY, Vol. 1149.
 - Frangipani, E.; Pérez-Martínez, I.; Williams, H. D.; Cherbuin, G.; Haas, D., 2014: A novel cyanide-inducible gene cluster helps protect *Pseudomonas aeruginosa* from cyanide. *Environmental Microbiology Reports.*, **6**, 28–34.
 - García-Contreras, R.; Nuñez-López, L.; Jasso-Chávez, R.; Kwan, B. W.; Belmont, J. A.; Rangel-Vega, A.; Maeda, T.; Wood, T. K., 2015: Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. *ISME Journal.*, **9**, 115–125.
 - GeoF, B.; Karen C, C.; Janet S, B.; Stephen A, M., 2007: *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* 19a edició. Editorial El manual moderno, México.
 - Hall, S.; McDermott, C.; Anoopkumar-Dukie, S.; McFarland, A. J.; Forbes, A.; Perkins, A. V.; Davey, A. K.; Chess-Williams, R.; Kiefel, M. J.; Arora, D.; Grant, G. D., 2016: Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins.*, **8**, 1–14.
 - Harrison, F.; Browning, L. E.; Vos, M.; Buckling, A., 2006: Cooperation and virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. *BMC Biology.*, **4**, 1–5.
 - Hartman, D. P.; Richard, A. D., 1977: Production and Detection of Staphylococcal Elastase, **15**, 59–65.
 - Hassan, H. M.; Fridovich, I., 1980: Mechanism of action of pyocyanine. *Journal of Bacteriology.*, **141**, 156–163.
 - Hassett, D.; Charniga, L. L.; Bean, K.; Ohman, D. E.; Scohen, M., 2011: Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Pyocyanin: Mechanisms of Resistance, Antioxidant Defenses, and Demonstration of a Manganese-Cofactored Superoxide Dismutase, **60**, 1–9.
 - Hassett, D. J.; Cohen, M. S., 1989: Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.*, **3**, 2574–2582.

- Hassett, D. J.; Charniga, L. L.; Bean, K.; Ohman, D. E.; Scohen, M., 1992: Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Pyocyanin: Mechanisms of Resistance, Antioxidant Defenses, and Demonstration of a Manganese-Cofactored Superoxide Dismutase, **60**, 1–9.
- Hassett, D. J.; Hassett, D. J., 1996: Anaerobic Production of Alginate by. *Microbiology.*, **178**, 7322–7325.
- Hassett, D. J.; Ma, J. F.; Elkins, J. G.; McDermott, T. R.; Ochsner, U. a; West, S. E.; Huang, C. T.; Fredericks, J.; Burnett, S.; Stewart, P. S.; McFeters, G.; Passador, L.; Iglewski, B. H., 1999: Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular microbiology.*, **34**, 1082–1093.
- Heurlier, K.; Haenni, M.; Guy, L.; Krishnapillai, V.; Haas, D., 2005: Avoid Cell Lysis and Death. *Journal of ...*, **187**, 4875–4883.
- Iiyama, K.; Takahashi, E.; Lee, J. M.; Mon, H.; Morishita, M.; Kusakabe, T.; Yasunaga-Aoki, C., 2017: Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters.*, **364**, 1–7.
- Kay, M. K.; Erwin, T. C.; McLean, R. J. C.; Aron, G. M., 2011: Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology.*, **77**, 821–829.
- Knight, M.; Hartman, P. E.; Hartman, Z.; Young, V. M., 1979: A new method of preparation of pyocyanin and demonstration of an unusual bacterial sensitivity. *Analytical Biochemistry.*, **95**, 19–23.
- Koh, C. L.; Sam, C. K.; Yin, W. F.; Tan, L. Y.; Krishnan, T.; Chong, Y. M.; Chan, K. G., 2013: Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors (Switzerland).*, **13**, 6217–6228.
- Lacey, K.; Geoghegan, J.; McLoughlin, R., 2016: The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. *Pathogens.*, **5**, 22.
- Lai, B. min; Yan, H. cong; Wang, M. zhen; Li, N.; Shen, D. sheng, 2018: A common evolutionary pathway for maintaining quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology.*, **56**, 83–89.
- Lee, J.; Jayaraman, A.; Wood, T. K., 2007: Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology.*, **7**, 1–15.
- Lee, J.; Attila, C.; Cirillo, S. L. G.; Cirillo, J. D.; Wood, T. K., 2009: Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microbial Biotechnology.*, **2**, 75–90.
- Lee, J. H.; Cho, M. H.; Lee, J., 2011: 3-Indolylacetonitrile Decreases *Escherichia coli* O157:H7 Biofilm Formation and *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Environmental Microbiology.*, **13**, 62–73.
- López, M.; Mayer, C.; Fernández-García, L.; Blasco, L.; Muras, A.; Ruiz, F. M.; Bou, G.; Otero, A.; Tomás, M.; Rodríguez-Baño, J.; Pascual, A.; Fernández Cuenca, F.; Pachón, J.; Cisneros, J. M.; Garnacho, J.; Gutierrez-Pizarra, A.; Márquez-Vácaro, J. A.; Martínez-Martínez, L.; Cano, M. E. et

- al., 2017: Quorum sensing network in clinical strains of *A. baumannii*: AidA is a new quorum quenching enzyme. *PLoS ONE.*, **12**, 1–18.
- Lyell, N. L.; Dunn, A. K.; Bose, J. L.; Stabb, E. V., 2010: Bright mutants of *Vibrio fischeri* ES114 reveal conditions and regulators that control bioluminescence and expression of the lux operon. *Journal of Bacteriology.*, **192**, 5103–5114.
 - Mahajan-Miklos, S.; Tan, M. W.; Rahme, L. G.; Ausubel, F. M., 1999: Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.*, **96**, 47–56.
 - Mainil, J., 2013: *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, **152**, 2–12.
 - Mavrodi, D. V; Bonsall, R. F.; Delaney, S. M.; Soule, M. J.; Phillips, G.; Thomashow, L. S., 2001a: Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology.*, **183**, 6454–6465.
 - Mavrodi, D. V; Bonsall, R. F.; Delaney, S. M.; Soule, M. J.; Phillips, G.; Thomashow, L. S., 2001b: Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology.*, **183**, 6454–6465.
 - Mellbye, B.; Schuster, M., 2011: of Concept The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance, **2**, 3–6.
 - Moradali, M. F.; Ghods, S.; Rehm, B. H. A., 2017: *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.*, **7**.
 - Naughton, M. a; Sanger, F., 1969: Purification and specificity of pancreatic elastase. *The Biochemical journal.*, **78**, 156–163.
 - O'Malley, Y. Q., 2004: *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology.*, **287**, L94–L103.
 - Olson, J. C.; Ohman, D. E., 1992: Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *Journal of Bacteriology.*, **174**, 4140–4147.
 - Park, Y., 2005: *Pseudomonas aeruginosa* Bacillus subtilis. *The Journal of Microbiology.*, **43**, 443–450.
 - Pearson, J. P.; Pesci, E. C.; Iglewski, B. H., 1997: Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes . Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes Dow. *Journal of Bacteriology.*, **179**, 5756–5767.
 - Pessi, G.; Haas, D., 2000: Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the

quorum-sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **182**, 6940–6949.

- Pessi, G.; Williams, F.; Hindle, Z.; Heurlier, K.; Holden, M. T. G.; Cámara, M.; Haas, D., 2001: The Global Posttranscriptional Regulator RsmA Modulates Production of Virulence Determinants and N-Acylhomoserine Lactones in *Pseudomonas aeruginosa* The Global Posttranscriptional Regulator RsmA Modulates Production of Virulence Determinants and N-Acylh, **183**, 6676–6683.
- Qi, L.; Li, H.; Zhang, C.; Liang, B.; Li, J.; Wang, L.; Du, X.; Liu, X.; Qiu, S.; Song, H., 2016: Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1–10.
- Recinos, D. A.; Sekedat, M. D.; Hernandez, A.; Cohen, T. S.; Sakhtah, H.; Prince, A. S.; Price-Whelan, A.; Dietrich, L. E. P., 2012: Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 19420–19425.
- Reszka, K. J.; O'Malley, Y.; McCormick, M. L.; Denning, G. M.; Britigan, B. E., 2004: Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, 1448–1459.
- Rinderknecht, H.; Geokas, M. C.; Silverman, P.; Haverback, B. J., 1968: A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clinica Chimica Acta*, **21**, 197–203.
- Roskams, J.; Rodgers, L., 2009: LB agar. *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2009p. pdb.rec11683-pdb.rec11683.
- Roskams, J.; Rodgers, L., 2016a: LB Liquid Medium. *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2016p. pdb.rec090928.
- Roskams, J.; Rodgers, L., 2016b: M9 Minimal Medium Buffer: *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2016p. pdb.rec088559.
- Rumbaugh, K. P.; Diggle, S. P.; Watters, C. M.; Ross-Gillespie, A.; Griffin, A. S.; West, S. A., 2009: Quorum Sensing and the Social Evolution of Bacterial Virulence. *Current Biology*, **19**, 341–345.
- Rutherford, S. T.; Bassler, B. L., 2012: Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**.
- Sabra, W.; Kim, E. J.; Zeng, A. P., 2002: Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology*, **148**, 3195–3202.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T., 1989: Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sandoz, K. M.; Mitzimberg, S. M.; Schuster, M., 2007: Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences., **104**, 15876–15881.

- Saucedo-Mora, M. A.; Castañeda-Tamez, P.; Cazares, A.; Pérez-Velázquez, J.; Hense, B. A.; Cazares, D.; Figueroa, W.; Carballo, M.; Guarneros, G.; Pérez-Eretza, B.; Cruz, N.; Nishiyama, Y.; Maeda, T.; Belmont-Díaz, J. A.; Wood, T. K.; García-Contreras, R., 2017: Selection of Functional Quorum Sensing Systems by Lysogenic Bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology.*, **8**, 1–10.
- Schreiber, K.; Krieger, R.; Benkert, B.; Eschbach, M.; Arai, H.; Schobert, M.; Jahn, D., 2007: The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *Journal of Bacteriology.*, **189**, 4310–4314.
- Schuster, M.; Greenberg, E. P., 2006: A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology.*, **296**, 73–81.
- Smalley, N. E.; An, D.; Parsek, M. R.; Chandler, J. R.; Dandekar, A. A., 2015: Quorum sensing protects *Pseudomonas aeruginosa* against cheating by other species in a laboratory coculture model. *Journal of Bacteriology.*, **197**, 3154–3159.
- Smith, A. C.; Rice, A.; Sutton, B.; Gabriliska, R.; Wessel, A. K.; Whiteley, M.; Rumbaugh, K. P., 2017: Albumin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and alters polymicrobial interactions. *Infection and Immunity.*, **85**, 1–12.
- Smith, R. S.; Iglewski, B. H., 2003: *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation.*, **112**, 1460–1465.
- Soberón-Chávez, G.; Lépine, F.; Déziel, E., 2005: Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **68**, 718–725.
- Sudhakar, T.; Karpagam, S.; Premkumar, J., 2015: Biosynthesis , antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1, **7**, 921–924.
- Sun Yoon, S.; Hennigan, R. F.; Hilliard, G. M.; Ochsner, U. A.; Parvatiyar, K.; Kamani, M. C.; Allen, H. L.; DeKievit, T. R.; Gardner, P. R.; Schwab, U.; Rowe, J. J.; Iglewski, B. H.; McDermott, T. R.; Mason, R. P.; Wozniak, D. J.; Hancock, R. E.; Parsek, M. R.; Noah, T. L.; Boucher, R. C. et al., 2002: *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis of toxic NO, a byproduct of anaerobic respiration. Proteomic analyses identified an outer membrane protein. *Developmental Cell.*, **3**, 593–603.
- Townend, J., 2002: *Practical Statistics for Environmental and Biological Scientists*.
- Van Delden, C.; Iglewski, B. H., 1998: Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases.*, **4**, 551–560.
- Wade, D. S.; Calfee, M. W.; Rocha, E. R.; Ling, a; Engstrom, E.; Coleman, J. P.; Everett, C.; Ling, E. a; Pesci, E. C., 2005: Regulation of *Pseudomonas*

quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology.*, **187**, 4372–4380.

- Wang, M.; Schaefer, A. L.; Dandekar, A. A.; Greenberg, E. P., 2015a: Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **112**, 2187–2191.
- Wang, M.; Schaefer, A. L.; Dandekar, A. A.; Greenberg, E. P., 2015b: Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters, **112**, 2187–2191.
- Whiteley, M.; Lee, K. M.; Greenberg, E. P., 1999: Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **96**, 13904–13909.
- Xavier, J. B.; Kim, W.; Foster, K. R., 2011: A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology.*, **79**, 166–179.



Pyocyanin Restricts Social Cheating in *Pseudomonas aeruginosa*

Paulina Castañeda-Tamez¹, Jimena Ramírez-Peris^{1,2}, Judith Pérez-Velázquez^{3,4}, Christina Kuttler⁴, Ammar Jalalimanesh^{4,5}, Miguel Á. Saucedo-Mora¹, J. Guillermo Jiménez-Cortés¹, Toshinari Maeda⁶, Yael González¹, María Tomás⁷, Thomas K. Wood⁸ and Rodolfo García-Contreras^{1*}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City, Mexico, ³ Institute of Computational Biology, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Neuherberg, Germany, ⁴ Zentrum Mathematik, Technische Universität München, Munich, Germany, ⁵ Iranian Research Institute for Information Science and Technology (IRANDOC), Tehran, Iran, ⁶ Department of Biological Functions Engineering, Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu, Japan, ⁷ Department of Microbiology, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, SERGAS, Universidade da Coruña, A Coruña, Spain, ⁸ Department of Chemical Engineering, The Pennsylvania State University, State College, PA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Satoshi Tsuneda,
Waseda University, Japan

Reviewed by:

Nina Jagmann,
Universität Münster, Germany
David Daudé,
Gene & GreenTK, France

*Correspondence:

Rodolfo García-Contreras
rgarc@bq.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 09 February 2018

Accepted: 04 June 2018

Published: 27 June 2018

Citation:

Castañeda-Tamez P, Ramírez-Peris J, Pérez-Velázquez J, Kuttler C, Jalalimanesh A, Saucedo-Mora MÁ, Jiménez-Cortés JG, Maeda T, González Y, Tomás M, Wood TK and García-Contreras R (2018) Pyocyanin Restricts Social Cheating in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 9:1348. doi: 10.3389/fmicb.2018.01348

Quorum sensing (QS) in *Pseudomonas aeruginosa* coordinates the expression of virulence factors, such as exoproteases and siderophores, that are public goods utilized by the whole population of bacteria, regardless of whether they invested or not in their production. These public goods can be used by QS defective mutants for growth, and since these mutants do not contribute to public goods production, they are considered social cheaters. Pyocyanin is a phenazine that is a toxic, QS-controlled metabolite produced by *P. aeruginosa*. It is a redox-active compound and promotes the generation of reactive oxygen species; it also possesses antibacterial properties and increases fitness in competition with other bacterial species. Since QS-deficient individuals are less able to tolerate oxidative stress, we hypothesized that the pyocyanin produced by the wild-type population could promote selection of functional QS systems in this bacterium. Here, we demonstrate, using competition experiments and mathematical models, that, indeed, pyocyanin increases the fitness of the cooperative QS-proficient individuals and restricts the appearance of social cheaters. In addition, we also show that pyocyanin is able to select QS in other bacteria such as *Acinetobacter baumannii*.

Keywords: public goods, pyocyanin, social cheating, quorum sensing (QS), oxidative stress, policing

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa uses QS to estimate its population density and to reprogram its gene expression and behavior accordingly. This system relies on the continuous production of small chemical signals known as autoinducers which are produced at a low rate until they accumulate and interact with their receptors. The receptors are activated by signal binding and induce transcription of the promoters of the genes encoding the enzymes that synthesize the autoinducers, which results in a sudden increase in autoinducer concentrations and receptor activation. Receptor activation also allows for increased transcription of several other genes allowing the coordination

of the expression of cooperative behaviors like the production of costly exoproducts such as exoenzymes and siderophores (Popat et al., 2015; García-Contreras, 2016). In *P. aeruginosa*, at least four interconnected QS systems exist; for two of them, LasIR and RhlIR, the autoinducer signals are *N*-acyl homoserine lactones while for the third system, PQS, hydrophobic quinolones are used, and for the fourth system, IQS, which is active mainly under conditions of phosphate starvation, 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde is used as the signal (Lee and Zhang, 2015). These subsystems are hierarchically organized, with LasIR at the top, in charge of the activation of the other systems (Castillo-Juarez et al., 2015; Papenfort and Bassler, 2016). In general, the costly exoproduct production which QS regulates can benefit all the individuals in the population, regardless if they invested in their production or not; hence, these exoproducts are public goods. Since the production of public goods is costly, the individuals that use them without contributing to their production are social cheaters (Diggle et al., 2007) and can invade the population, causing a tragedy of the commons (Sandoz et al., 2007). It has been demonstrated in *P. aeruginosa* that cheating behavior exists for both exoprotease production (Diggle et al., 2007) and for the production of the main siderophore pyoverdine (Kummerli et al., 2009). In the first case, cheaters (mutants deficient in *lasR*) naturally emerge in cultures with protein as the sole carbon source and also have been isolated from several environments such as the lungs of cystic fibrosis patients (Sandoz et al., 2007; Hoffman et al., 2009; Dandekar et al., 2012; García-Contreras et al., 2015a). In the second case, mutants unable to produce pyoverdine are selected in iron deficient media (Dumas and Kummerli, 2012).

However, although cheating exists in nature, QS systems that regulate public goods are common; hence, factors that counteract the effects of social cheaters should exist. For *P. aeruginosa*, those mechanisms include the growth of bacteria in conditions that allow the physical separation of cooperators and cheaters, decreasing the cheater's fitness (Hense et al., 2007; Mund et al., 2016). This occurs during the growth in highly viscous medium, since viscosity limits diffusion of public goods such as siderophores (Kummerli et al., 2009). Another way to counteract social cheating is to combine the assimilation of protein, which depends on the production of exoproteases that are exploited by cheaters, with the assimilation of adenosine, whose catabolism is also QS-dependent, but in contrast to the extracellular protein, it is mediated by intracellular private enzymes (Dandekar et al., 2013). Finally environmental factors such as the presence of toxic compounds such as H₂O₂ (García-Contreras et al., 2015b) and HCN (Wang et al., 2015), and the presence of some temperate phages (Saucedo-Mora et al., 2017) also restrict social cheating, since QS deficient mutants are more sensitive to stress due a lower expression of anti-oxidant enzymes such as catalase and superoxide dismutase (Hassett et al., 1999), and likely due to a lack of modifications that enhance membrane tolerance to stress (Davenport et al., 2015). In addition, a lower expression of cyanide insensitive cytochrome oxidase may contribute to their higher sensitivity toward HCN (Wang et al., 2015).

One of the main QS-controlled virulence factors are the phenazines, dibenzo annulated pyrazines with diverse activities

such as: (i) cell signaling (Dietrich et al., 2006), (ii) biofilm formation (Ramos et al., 2010; Wang et al., 2011), (iii) survival in anaerobiosis (Wang et al., 2010), (iv) fitness in the presence of competitor bacteria (Smalley et al., 2015), (v) resistance to gallium nitrate (García-Contreras et al., 2013; Rezzoagli et al., 2017) and other toxic metals such as silver (Muller and Merrett, 2014), and (vi), damage to host cells (Rada and Leto, 2013), among others.

Pyocyanin, one of the main phenazines of *P. aeruginosa*, is produced by several clinical strains from pulmonary and extra-pulmonary infections (Schaber et al., 2004; García-Contreras et al., 2015b; Guendouze et al., 2017) as well as in environmental strains (Grosso-Becerra et al., 2014) and is found in high concentrations [up to 100 μM (Caldwell et al., 2009) in the lung of cystic fibrosis patients]. Due to its redox activity, pyocyanin increases the production of reactive oxygen species by donating electrons to oxygen, thereby producing hydrogen peroxide. Moreover, pyocyanin also depletes the pools of antioxidant molecules like glutathione. Taking these results into account as well as the fact that QS-defective mutants are less able to cope with oxidative stress (García-Contreras et al., 2015b) and likely have membranes more sensitive to oxidative stress than QS-proficient individuals due lower levels of cyclopropanation and lower levels of fatty acid saturation (Davenport et al., 2015), we hypothesized that pyocyanin may differentially affect this population and may act as a policing metabolite. To test this hypothesis, we performed competition experiments and developed mathematical models; our results show that indeed the production of this metabolite selects for the presence of QS.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

Pseudomonas aeruginosa PA14, and the *lasR rhlR* mutant were donated by Dr. You-Hee Cho from the College of Pharmacy, CHA University, South Korea (Park et al., 2005). The PA14 *phzM* mutant (40343 from the collection) was provided by Dr. Frederick Ausubel from the Harvard Medical School (Liberati et al., 2006). In order to avoid differences between PA14 genetic backgrounds, the *phzM* mutation was incorporated into the PA14 strain from South Korea by phage transfection using the DMS3 phage (Budzik et al., 2004). The *Acinetobacter baumannii* mutant with the *abaI* gene deleted was generated using the pMol130 plasmid (Hamad et al., 2009) which carries the *aphA* gene that provides kanamycin resistance, the *xylE* gene that allows visual detection of the mutants, and the modified *sacB* gene that allows the resolution of the co-integrants. The mutants were confirmed by sequencing and real-time PCR with Taqman probes (see Supplementary Table S1 for the primer sequences).

Pre-cultures of all strains were grown in LB at 37°C with 200 rpm shaking for ~16 h. For the *phzM* mutant, gentamicin at 15 μg mL⁻¹ was added. The pre-cultures were then used for the inoculation of flasks with M9 minimal medium supplemented with 0.25% of sodium caseinate as the sole carbon source (M9 caseinate medium) with or without exogenous protease

(type XIV p5147, from SIGMA at 1 unit/ml) or with the same medium with 0.25% of casamino acids as a sole carbon source or with LB medium, and the cultures were grown under the same conditions. Growth was monitored by recording the increase of the turbidity (600 nm) with a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu).

Bactericidal Effect of Pyocyanin

To evaluate the bactericidal effect of pyocyanin, wild-type, the *lasR rhlR* mutant and the *phzM* mutant cells were cultured in LB to turbidity at 600 nm of 1.0, then samples (1 mL) were taken and pyocyanin at 50 or 100 μ M was added. Cells were exposed for 30 min, and viable counts were used to determine the degree of survival.

Effect of Pyocyanin in the Selection of Social Cheaters

Single colonies were inoculated into LB medium to form precultures that were transferred to M9 caseinate medium (initial turbidity of \sim 0.05 at 600 nm); each culture was incubated for 24 h and was used for inoculating subsequent cultures (also at an initial turbidity of \sim 0.05) with or without the addition of 100 μ M pyocyanin (added to the medium before inoculation). The percentage of protease-less producer colonies after each 24 h culture was evaluated by plating colonies (between 25 and 50 per culture) and visualizing the casein degradation halo in LB plates with 3% skimmed milk.

Competition Experiments

Cultures in M9 caseinate medium were inoculated with different proportions of the wild-type PA14 strain and the *lasR rhlR* mutant or the *phzM* mutant and the *lasR rhlR* mutant. For all cases, enough bacteria to achieve an initial turbidity at 600 nm of \sim 0.05 was used, then the cultures were grown under the same conditions detailed above. Samples of each culture were taken after 0, 4, 6, 10, and 24 h of cultivation and were used to isolate colonies. The proportion of PA14 and the *lasR rhlR* mutant was determined by evaluating casein degradation.

For evaluating the effect of pyocyanin in the competition between the *lasR rhlR* mutant and the *phzM* mutant, pyocyanin was purified by the extraction with chloroform and 0.2 M HCl (Essar et al., 1990), and its purity was verified by comparing its absorbance spectrum with commercial pyocyanin (SIGMA, St. Louis, MO, United States). Pyocyanin (neutralized with NaOH) was added at 25 μ M to the cultures, and at 4, 6, 10, and 24 h, samples were taken to estimate the proportion of QS mutant and *phzM* populations.

A. *baumannii* Competition

Acinetobacter baumannii ATCC-17978 and its isogenic *abaI* mutant were cultured in LB medium until they reached to the early stationary phase (turbidity at 600 nm \sim 2.0), and then 500 μ l of each culture was mixed in 2 mL tubes with or without 50 μ M of pyocyanin and incubated for 20 min under the same conditions. Samples of the mixtures were taken before adding pyocyanin and after the incubations for isolating

colonies that were then plated on blood agar plates; plates were incubated for 16 h at 37°C and then the identity of these colonies was determined by PCR. A total of 140 colonies were screened using two PCR reactions: one for the identification of the *abaI* gene and the other for the house keeping gene *pbpC* using primers 5'-CCAATATCATTTGGTTGTGCC and 5'-TCGTAATGAGTTGTTTTGCG that yield a product of 255 bp for *abaI*, and the primers 5'-TTTGACTGGGATGGTATTCG and 5'-GGAATCTGGGTGCTATTCAT that yield a product of 419 bp for *pbpC*.

Pyocyanin and Exoprotease Assay

Pyocyanin concentrations were determined spectrophotometrically after the extraction with chloroform and 0.2 M HCl (Essar et al., 1990). The absorbance at 520 nm was used with an ϵ of 2.46 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (O'Malley et al., 2004). Elastase was determined by quantifying the production of Congo red from the hydrolysis elastine-Congo red complex (SIGMA) (Ohman et al., 1980), and alkaline protease concentrations were determined by the production of remazol brilliant blue R from the hydrolysis of the Hide-Remazol Brilliant Blue R powder (SIGMA) (Howe and Iglewski, 1984).

Catalase Assay

Catalase activity was determined by recording the conversion of H_2O_2 to $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, spectrophotometrically at 240 nm and 37°C in Tris (50 mM at pH 7). PA14 and the QS mutants cells were grown in M9 medium with 0.25% of casamino acids to the middle exponential phase (turbidity \sim 1.0 at 600 nm), then 1 mL of each culture was harvested by centrifugation; the cell pellets were washed in the same reaction buffer once, resuspended in 250 μ L of the buffer, and half of the cells were mixed with 125 μ L of a permeabilization solution (100 mM dibasic sodium phosphate, 20 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.8 mg/mL CTAB, 0.4 mg/mL sodium deoxycholate), incubated for 20 min at 37°C, and then used to determine activity. In parallel, 1 mL of each culture was exposed to 25 μ M of pyocyanin at 37°C for 30 min and after that, cell pellets were obtained and the procedures described before were followed to determine the effect of pyocyanin in the catalase activity. Protein concentrations were determined by the Bradford method, and catalase activity was expressed as nanomol of H_2O_2 degraded per minute per mg of protein.

Statistical Analysis

All experiments were done at least in triplicate. Statistical significances for **Figures 3, 4, 6** were evaluated by using a Student's two-tailed test and considered significant if $P < 0.05$. Statistical significance for **Figure 5** was evaluated by a chi-squared test and considered significant if $P < 0.05$.

Mathematical Modeling

A spatial stochastic mathematical model was developed to further explore the role of pyocyanin in the selection of the QS phenotype during the competition experiments. A deterministic mathematical model was used to compute some of the parameters involved. A detailed description of the models can be found in the Supplementary Materials.

RESULTS

Pyocyanin Selects the Wild-Type Phenotype in Competition With Non-protease Producer Mutants

Our first approximation to evaluate factors that stabilize QS in *P. aeruginosa* was to test their effect in the outcome of competition experiments between the PA14 wild-type strain and non-protease producer, the *lasR rhIR* mutant, in medium with caseinate as the sole carbon source. In this medium, the only way mutants can grow is by utilizing the peptides and amino acids produced by the hydrolysis of casein by the QS-controlled exoproteases synthesized and exported by the wild-type strain; hence, *lasR rhIR* mutants behaved as social cheaters that exploit the cooperators (wild-type) individuals (Diggle et al., 2007; García-Contreras et al., 2015b). Growth curves of PA14, the *lasR rhIR* mutant, and their mixtures containing an initial proportion of 10, 50, and 90% of the *lasR rhIR* mutant population confirmed that the *lasR rhIR* mutant was unable to grow in caseinate as the sole carbon source after 24 h of cultivation and show that increasing the initial proportion of the *lasR rhIR* mutant decreased the growth yields of the cultures after 24 h of cultivation (Supplementary Figure S1). In addition, the overall growth rate of the population also decreased with increasing initial amounts of the *lasR rhIR* mutant, indicating that the presence of QS cheaters is a burden for the system's growth.

In agreement with previous findings, the proportion of the *lasR rhIR* mutant populations substantially increased with time (Mellbye and Schuster, 2011; Gerdt and Blackwell, 2014). After 24 h of culture, the percentage of the *lasR rhIR* mutant was of approximately 50, 75, and 97% when the initial proportions were approximately 10, 50, and 90%, respectively (Figure 1), validating that the *lasR rhIR* mutant grows at the expense of the wild-type that produced exoprotease under this condition.

These equilibrium final proportions were reached around 10 h and remained mostly stable (the mutant fraction only increased slightly) after 24 h. Critically, the stable final proportions consisted of lower amounts of the mutant when the amount of mutants in the inoculum was lower; hence, the final proportions depended on the initial proportions, indicating that probably factors produced by the cooperative PA14 individuals were restricting further increases in the mutant proportion. In our experiments, it was clear that the production of a potential toxic metabolite by the wild-type PA14 population, the phenazine pyocyanin, was high and its amount positively correlated with a higher initial wild-type proportion as expected (Figure 2). The production of pyocyanin is positively regulated by the LasR/RhlR systems (Dekimpe and Deziel, 2009), and the mutant we used was unable to produce pyocyanin (García-Contreras et al., 2015b).

Therefore, competition experiments between a non-pyocyanin producer but QS-active strain, the *phzM* mutant, and the *lasR rhIR* mutant were conducted; the results indicated that after 6 and 10 h, the relative frequency of the *lasR rhIR*

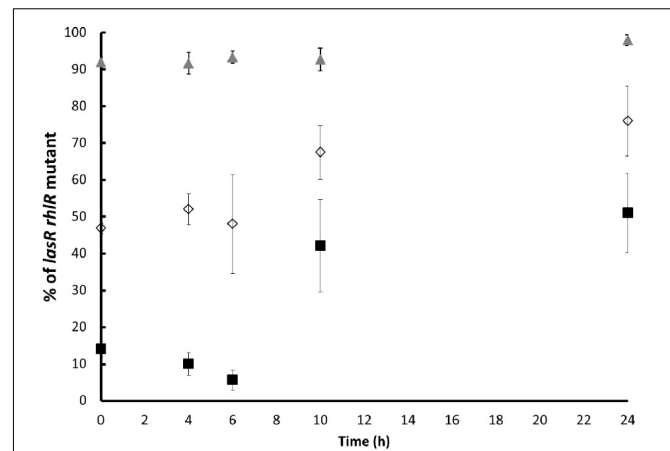


FIGURE 1 | Proportion of the *lasR rhIR* mutant during competition with the PA14 wild-type in caseinate medium. The initial proportion of the mutant was approximately 10% (black squares), 50% (white diamonds), and 90% (gray triangles). Experiments were performed in quintuplicate, and the average \pm SEM are shown. The differences between all the proportions at the initial time vs. all the proportions at 10 h are significant, except for the proportion of 90%. The differences between all the proportions at the initial time vs. all the proportions at 24 h were significant, and no significant difference was found between 10 and 24 h for any case ($P < 0.05$ in a one tailed *T*-student test).

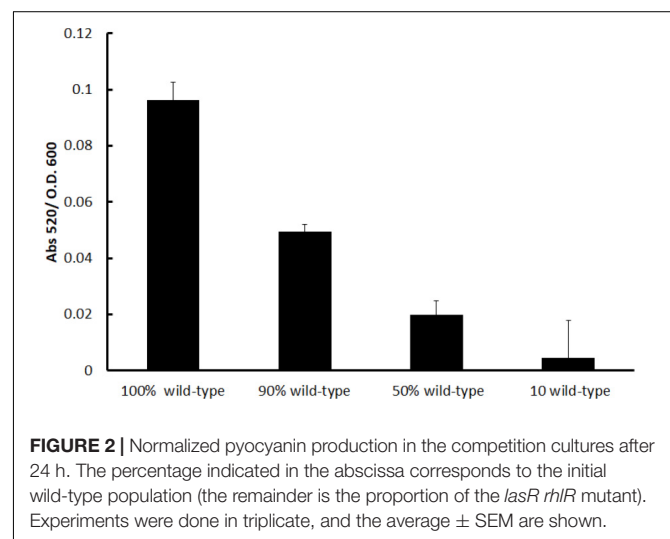


FIGURE 2 | Normalized pyocyanin production in the competition cultures after 24 h. The percentage indicated in the abscissa corresponds to the initial wild-type population (the remainder is the proportion of the *lasR rhIR* mutant). Experiments were done in triplicate, and the average \pm SEM are shown.

mutant was significantly higher than when they were competing against PA14 when the initial mutant proportion was 10% (Figure 3A). In agreement, the addition of pyocyanin to the *phzM* vs. *lasR rhIR* mutant competition experiments strongly decreased the frequency of the *lasR rhIR* mutant at 10 h for initial proportions of 10% (Figure 3B) and 90% of mutants (Figure 3C), demonstrating that in addition to HCN, pyocyanin was also capable of restricting cheating (*lasR rhIR* mutant).

Control growth experiments of the three strains (PA14 wild-type, the *lasR rhIR* mutant, and the *phzM* mutant) in M9 medium with 0.25% of casamino acids as the sole carbon source and with 0.25% caseinate plus exogenous protease showed almost

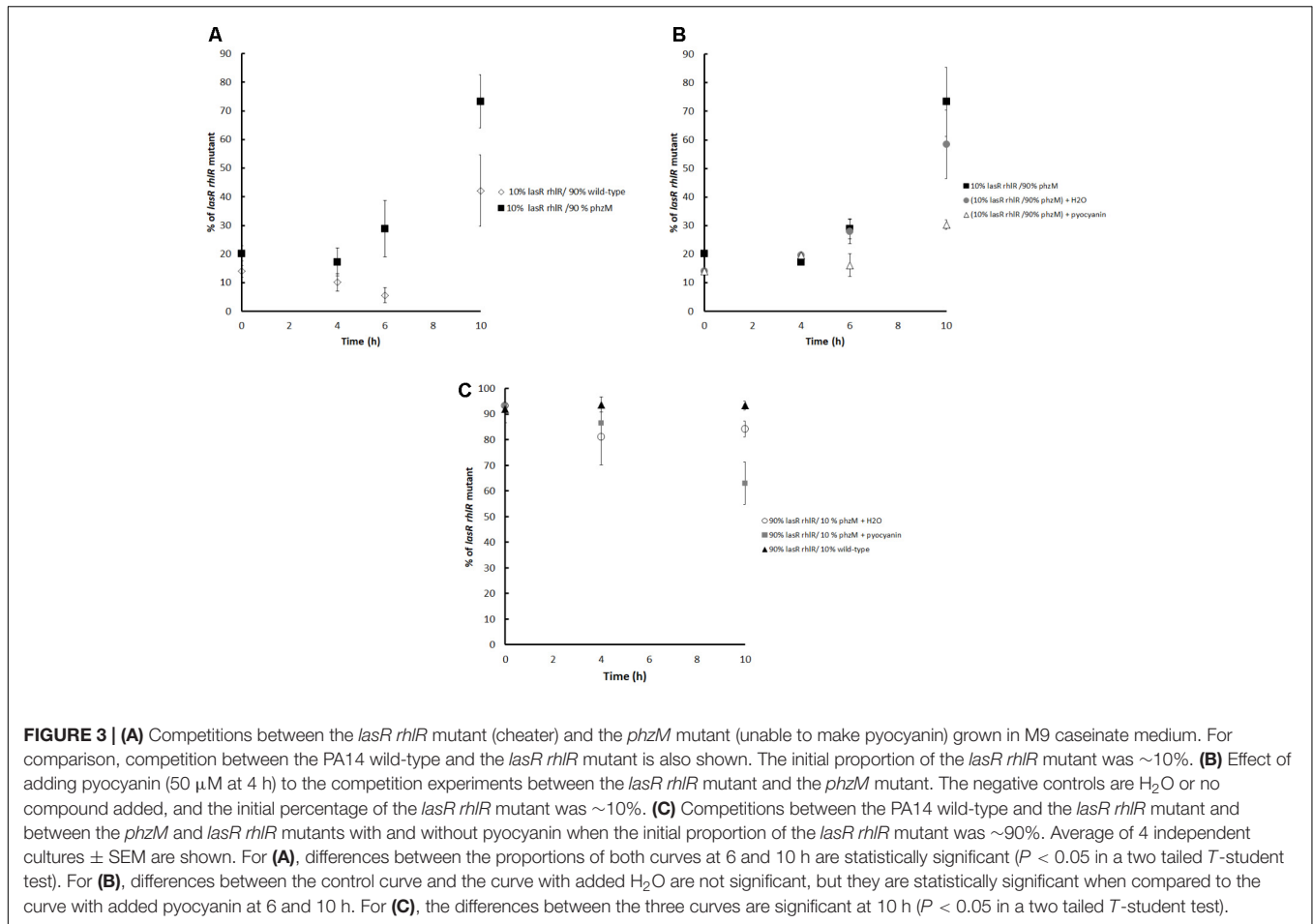


TABLE 1 | *P. aeruginosa* strains characteristics.

Strain	Growth rate in caseinate 0.25% (h ⁻¹)	Growth rate in caseinate 0.25% + protease (h ⁻¹)	Growth rate in casamino acids 0.25% (h ⁻¹)	Pyocyanin (μM)	Exoprotease skimmed milk	Elastase (Abs 595 nm)	Collagenase (Abs 495 nm)
PA14 wt	0.39 \pm 0.12	0.73 \pm 0.05	1.06 \pm 0.02	127 \pm 0.8	++	3.36 \pm 0.49	2.4 \pm 0.42
<i>phzM</i>	0.12 \pm 0.02	0.73 \pm 0.04	0.99 \pm 0.04	1 \pm 0.3	+	1.18 \pm 0.24	1.06 \pm 0.9
<i>lasR rhIR</i>	Do not growth	0.79 \pm 0.03	1.07 \pm 0.026	Not determined	-	Not determined	Not determined

no difference in the growth rates of the strains **Table 1** and Supplementary Figures S2A,B.

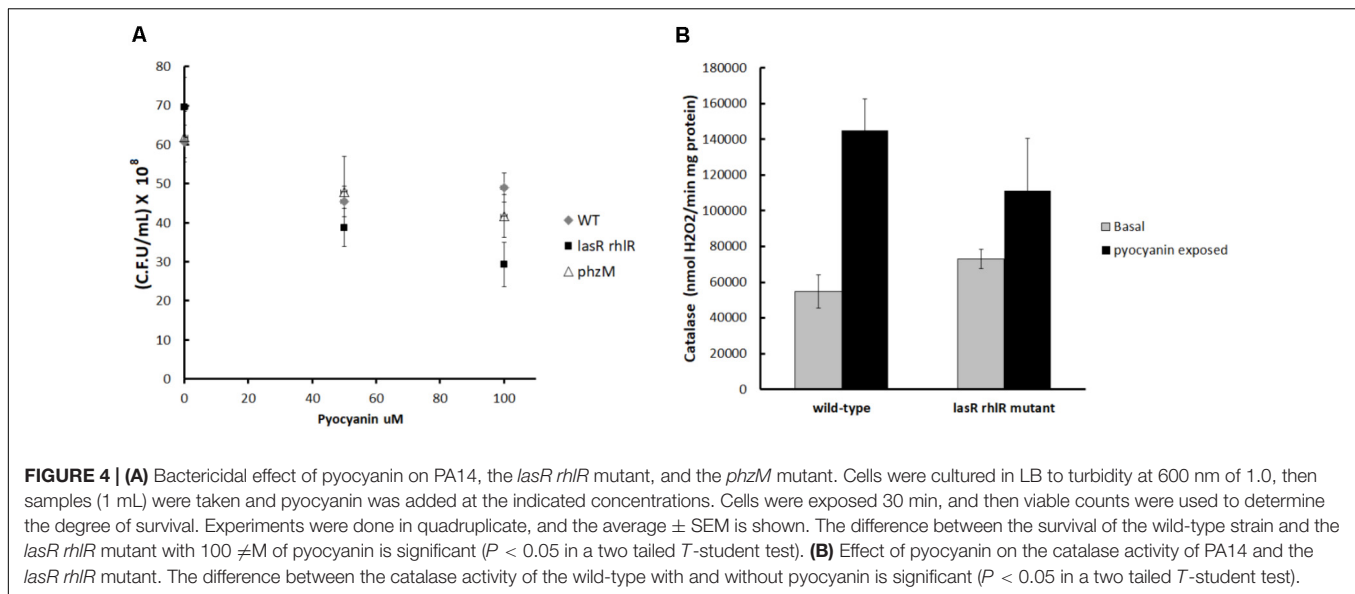
Pyocyanin Toxicity

In agreement with the competition experiments, the bactericidal effect of pyocyanin on the *lasR rhIR* mutant was greater than its effect on PA14 and the *phzM* mutant (**Figure 4A**). Also the addition of pyocyanin was able to significantly induce the activity of catalase in PA14 cultures but not in the *lasR rhIR* mutant (**Figure 4B**), indicating that phenazine was indeed inducing production of H₂O₂, which then induced catalase (essentially a private good) in the QS-proficient cells but not in the *lasR rhIR* mutant. This increase in catalase activity likely allowed PA14 to detoxify H₂O₂ faster than the *lasR rhIR* mutant.

Mathematical Model of the Competitions

In order to further explore the above-described phenomena, two mathematical models were created: one based on ordinary differential equations (ODEs) and an agent-based model (ABM). The use of ODEs allowed us to verify that the most essential mechanisms of the system had been taken into account as the model could be fitted well to the observed data (Supplementary Materials and Supplementary Figure SM1). Furthermore, the fitting procedure provided quantitative information about several of the parameters involved, such as production rates. Therefore, the same mechanisms were taken into account to set up an ABM.

An ABM is a mathematical spatial model which allows one to simulate the spatio-temporal dynamics of agents (in this case bacterial cells) under diverse conditions. It



is composed of an initial spatial configuration of agents and allows simulating the interactions of these agents to assess the collective behavior over time and space. This type of model allows to re-create observed behavior but also to predict the appearance of emergent interactions. Our model was composed of the agents, behavioral and interaction rules as well as an environment (a 2D domain in our case) where all takes place. As an ABM allows us to simulate specific scenarios, this results on numerical simulations, the output of such models. In Supplementary Figure SM2, the result of one of such simulations at a fixed time is shown, the output is visualized as a set of microcolonies of wild-type and QS deficient mutants that grow (in two dimensions) by the assimilation of digestible nutrients (peptides and amino acids), derived from non-digestible ones (caseinate) by the action of exoproteases produced only by the wild-type population. In Supplementary Figure SM3, the dynamics of both populations as a function of time in the absence and presence of pyocyanin (which exerts a bactericidal effect only in the QS deficient mutants) are simulated, showing indeed a decrease in the mutant population as an effect of pyocyanin. Furthermore, the model (i) predicts that pyocyanin would have only very subtle effects on the concentrations of autoinducers, caseinate and exoproteases (Supplementary Figure SM4), (ii) shows how pyocyanin concentration changes with time (Supplementary Figure SM5), and (iii) predicts that an increase of the diffusion of the digestible nutrients strongly increases the selection of the QS deficient mutants.

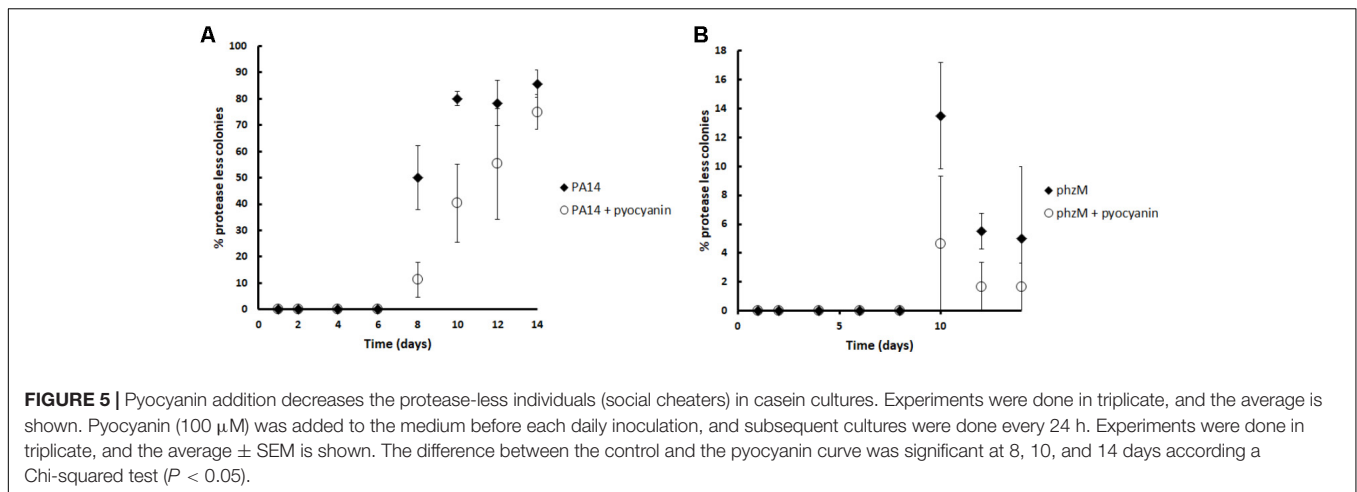
This type of model can help to choose suitable arrangements for future experiments, to explore certain effects visibly and to understand better the behavior of such systems in a more realistic, heterogeneous environment such as biofilms. Evidence suggests that physical properties of the environment may play an important role in competition (Mund et al., 2017).

Pyocyanin Restricts the Appearance of Natural Selected Social Cheaters

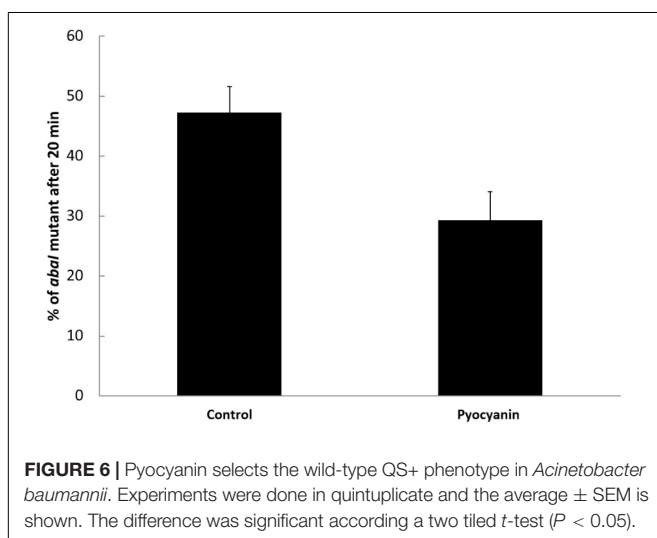
In addition to the short time competition experiments, we decided to test if pyocyanin could restrict the appearance of social cheaters in long term experiments in a population that was entirely composed of wild-type individuals at the beginning. For this, cultures in M9 caseinate medium were started from a single wild-type colony and several consecutive daily subcultures in the same medium were done with or without the addition of 100 μM of pyocyanin before each pass. As expected, after eight culture passes, protease-less mutants (cheaters) began to appear and their proportion increased until pass number fourteen; however, in agreement with our previous experiments, the addition of pyocyanin significantly decreased the proportion of social cheaters at days 8, 12, and 14 (Figure 5A). As expected, pyocyanin addition also decreased the cheater proportion in cultures initiated with the *phzM* mutant (Figure 5B); nevertheless, these differences were not significant and the proportion of cheaters that emerged in the *phzM* background was lower than the observed for the wild-type strain.

Pyocyanin Selects Active QS in *A. baumannii*

After demonstrating that pyocyanin selected for active QS in *P. aeruginosa*, we also tested its effect in another bacterial species, *A. baumannii*, an important nosocomial pathogen able to coexist with *P. aeruginosa* and a strain that upregulates its catalase activity via QS. It was previously shown that the deletion of *abaI* impairs production of homoserine lactone and increases sensitivity to pyocyanin (Bhargava et al., 2014). To test if pyocyanin could also select QS in *A. baumannii*, competitions between the wild-type ATCC17978 strain and its isogenic *abaI* mutant were conducted by mixing equal quantities of both strains grown in LB (in which they grow with virtually identical growth



rates of 1 ± 0.05 and $1.03 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, Supplementary Figures S2A,C) and growing to the exponential phase and by incubating for 20 min with 50 μ M of pyocyanin. These competitions were made only at short times to avoid sensing of the wild-type-produced homoserine lactone by the *abaI* mutant. In order to estimate the initial and final proportions of the strains, PCR amplification of the *abaI* gene was performed. Our results showed that without pyocyanin, the initial mutant proportion remained stable, whereas the addition of pyocyanin decreased the mutant to around half the initial proportion (Figure 6). These results, as for *P. aeruginosa*, correlate with higher catalase activity of the wild-type strain relative to the activity of the QS defective mutant and with a significant induction of catalase by the addition of pyocyanin only in the case of the wild-type strain (Supplementary Figure S3). Hence, we found that the pyocyanin produced by *P. aeruginosa* can select for QS in another bacterial system; therefore, the influence of pyocyanin in bacterial ecology may be broad.



DISCUSSION

In this work, we demonstrated that pyocyanin is able to select functional QS systems in both *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. The toxicity of pyocyanin is due its generation of oxygen-reactive species, including H_2O_2 , that cause cell lysis (Das and Manefield, 2012). Our results are in concordance with the fact that in *P. aeruginosa*, QS mutants are more sensitive to several kinds of stress than the strains with functional QS systems (García-Contreras et al., 2015b). These stresses include heat shock, heavy metal stress, and oxidative stress by H_2O_2 (García-Contreras et al., 2015b). Hence, the addition of H_2O_2 selects for active QS systems during growth on casein as the sole carbon source, which requires the production of QS-controlled exoproteases (García-Contreras et al., 2015b). The lower tolerance of QS mutants to stress may be linked to a deficient expression of antioxidant enzymes during an insult (García-Contreras et al., 2015b), as well to other phenomena such as the production of less robust cell membranes by the QS deficient individuals (Davenport et al., 2015). Critically, stress in general is omnipresent in the variable natural environments of bacteria, and oxidative stress in particular is a common strategy used to fight bacterial pathogens in eukaryotes (Hampton et al., 1998; Abramovitch and Martin, 2004; Vallet-Gely et al., 2008).

Interestingly, a recent publication in which the role of nitrogen source in the selection of social cheaters was evaluated; it shows that in those cultures in which the population remained stable (tragedy of the commons was avoided), the cooperators evolved by decreasing their exoprotease production and by increasing their production of pyocyanin (Lai et al., 2018). This result complements our findings by suggesting that overexpression of this toxin may be a natural strategy to counteract social cheating.

Although for this work we did not explore the effect of pyocyanin in competitions under conditions in which cheating is not present, pyocyanin may also select the wild-type phenotype under these kinds of conditions over QS

defective mutants. Moreover, other redox active phenazines like phenazine-1-carboxylic acid may also participate in QS selection, but this remains to be explored. In addition, there may be possible contributions to the observed effects mediated by the pyocyanin biosynthetic intermediate 5-methyl phenazine-1-carboxylic acid since the *phzM* mutant also is deficient in its production.

Intriguingly, although we predicted that a higher number of cheaters would arise in the case of *phzM* cultures than in the wild-type cultures (since the wild-type strain produces pyocyanin), we observed the opposite (**Figure 5B**). We speculate that this result may be caused by a lower exoprotease activity of the *phzM* mutant compare to the parental strain. Accordingly, the *phzM* mutant has significantly lower collagenase and elastase activities (data not shown) which will decrease cheater fitness. In addition, we cannot rule out the presence of compensatory mechanisms that counteract the cheater fitness, like perhaps a higher synthesis of HCN. Nevertheless, this hypothesis needs to be tested.

Generally, various kinds of stress tend to be positively correlated with cell density due to competition for resources or the accumulation of waste products. This probably explains why an increasing number of private stress responses are shown to be QS regulated (Cornforth and Foster, 2013; García-Contreras et al., 2015b). We thus hypothesize that – as a side effect – one of the main stabilizing mechanisms of cooperation via public goods are QS-regulated private stress responses (García-Contreras et al., 2015b), although QS controlled stress responses do not need to be private (Friman et al., 2013; Sun et al., 2015).

Stabilization of cooperation by the QS-regulated stress response acts complementarily to stabilization by metabolic prudence (Xavier et al., 2011). The metabolic prudence concept explains that cells produce public goods preferentially when the cost of their production and impact on individual fitness is low, and under such conditions non-producing cheaters have no fitness benefit. In contrast, our study showed that pleiotropic stabilization of cooperation via public goods also works when cooperative production of public goods is associated with fitness costs for the producer.

Overall, we demonstrate that although cheating decreases the fitness of QS proficient individuals in the absence of stress, the higher susceptibility of QS mutants to the pyocyanin produced by the wild-type strain allows for the preservation of functional QS systems; i.e., pyocyanin promotes the selection of more virulent bacteria. Hence, our results provide a new example of social policing by the cooperators and complement the findings of Wang and colleagues that in 2015 showed that QS-controlled production of toxic HCN by cooperative individuals decreases the fitness of the social cheaters, because social cheaters are more susceptible to HCN than cooperators, presumably by the lack of expression of an HCN insensitive cytochrome oxidase that is positively controlled by QS (Wang et al., 2015).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PC-T, JR-P, MS-M, YG, and MT performed the experiments. JP-V, CK, and AJ made the mathematical model. RG-C, JP-V, CK, TM, JJ-C, and TW conceived the study. RG-C, JP-V, CK, and TW wrote the manuscript. JJ-C analyzed the data.

FUNDING

This work was supported by grants from PAPIIT UNAM No. IA201116, PAPIIT UNAM IN 214218, and Projects for Solving National Problems/CONACyT Mexico No. 2015-01-402 for RG-C, and by the Army Research Office (W911NF-14-1-0279) to TW, and PI16/01163, awarded to MT within the State Plan for R+D+I 2013–2016 (National Plan for Scientific Research, Technological Development and Innovation 2008–2011) and co-financed by the ISCIII-Deputy General Directorate of evaluation and Promotion of Research – European Regional Development Fund “A way of Making Europe” and Instituto de Salud Carlos III FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI, RD16/0016/0001 and RD16/0016/0006) as well as the Study Group on Mechanisms of Action and Resistance to Antimicrobials, GEMARA (SEIMC, <http://www.seimc.org/>). MT was financially supported by the Miguel Servet Research Program (SERGAS and ISCIII). AJ thanks DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), for funding his stay at Technische Universität München, Munich, Germany. TW is the Biotechnology Endowed Chair at the Pennsylvania State University.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Frederick Ausubel from the Harvard Medical School and Dr. You-Hee Cho from the College of Pharmacy, CHA University, South Korea for the PA14 strains. We are grateful for the help of Abigail González-Valdez with the transfection of the *phzM* mutation. RG-C thanks Beatriz Meraz-Rios, Yahira Katherine Porras Hernandez, Berenice Perez-Eretza, and Dánae Díaz Ramírez for their assistance with some experiments. In addition, we are also grateful for the insights and inspiration provided by our dear colleague Prof. Burkard Hense (who sadly passed away last year). He was very involved at the initial stages of this project; this manuscript honors his memory.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01348/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abramovitch, R. B., and Martin, G. B. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 356–364. doi: 10.1016/j.pbi.2004.05.002
- Bhargava, N., Sharma, P., and Capalash, N. (2014). Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Immun.* 82, 3417–3425. doi: 10.1128/IAI.01600-14
- Budzík, J. M., Rosche, W. A., Rietsch, A., and O'Toole, G. A. (2004). Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14. *J. Bacteriol.* 186, 3270–3273. doi: 10.1128/JB.186.10.3270-3273.2004
- Caldwell, C. C., Chen, Y., Goetzmann, H. S., Hao, Y., Borchers, M. T., Hassett, D. J., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 175, 2473–2488. doi: 10.2353/ajpath.2009.090166
- Castillo-Juarez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E. A., Tomas, M., Perez-Eretza, B., Garcia-Contreras, S. J., et al. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J. Clin. Cases* 3, 575–598. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.575
- Cornforth, D. M., and Foster, K. R. (2013). Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 285–293. doi: 10.1038/nrmicro2977
- Dandekar, A. A., Chugani, S., and Greenberg, E. P. (2012). Bacterial quorum sensing and metabolic incentives to cooperate. *Science* 338, 264–266. doi: 10.1126/science.1227289
- Dandekar, A. A., Chugani, S., and Greenberg, E. P. (2013). Bacterial quorum sensing and metabolic incentives to cooperate. *Science* 338, 264–266. doi: 10.1126/science.1227289
- Das, T., and Manefield, M. (2012). Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7:e46718. doi: 10.1371/journal.pone.0046718
- Davenport, P. W., Griffin, J. L., and Welch, M. (2015). Quorum sensing is accompanied by global metabolic changes in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 197, 2072–2082. doi: 10.1128/JB.02557-14
- DeKimpfe, V., and Deziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155, 712–723. doi: 10.1099/mic.0.022764-0
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., and Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 61, 1308–1321. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x
- Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S., and West, S. A. (2007). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450, 411–414. doi: 10.1038/nature06279
- Dumas, Z., and Kummerli, R. (2012). Cost of cooperation rules selection for cheats in bacterial metapopulations. *J. Evol. Biol.* 25, 473–484. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02437.x
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 172, 884–900. doi: 10.1128/jb.172.2.884-900.1990
- Friman, V. P., Diggle, S. P., and Buckling, A. (2013). Protist predation can favour cooperation within bacterial species. *Biol. Lett.* 9:20130548. doi: 10.1098/rsbl.2013.0548
- García-Contreras, R. (2016). Is quorum sensing interference a viable alternative to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Front. Microbiol.* 7:1454. doi: 10.3389/fmicb.2016.01454
- García-Contreras, R., Lira-Silva, E., Jasso-Chavez, R., Hernandez-Gonzalez, I. L., Maeda, T., Hashimoto, T., et al. (2013). Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 574–582. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.07.009
- García-Contreras, R., Nunez-Lopez, L., Jasso-Chavez, R., Kwan, B. W., Belmont, J. A., Rangel-Vega, A., et al. (2015a). Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. *ISME J.* 9, 115–125. doi: 10.1038/ismej.2014.98
- García-Contreras, R., Perez-Eretza, B., Jasso-Chavez, R., Lira-Silva, E., Roldan-Sanchez, J. A., Gonzalez-Valdez, A., et al. (2015b). High variability in quorum quenching and growth inhibition by furanone C-30 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Pathog. Dis.* 73:ftv040. doi: 10.1093/femspd/ftv040
- Gerdt, J. P., and Blackwell, H. E. (2014). Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria. *ACS Chem. Biol.* 9, 2291–2299. doi: 10.1021/cb5004288
- Grosso-Becerra, M. V., Santos-Medellin, C., Gonzalez-Valdez, A., Mendez, J. L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., et al. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 15:318. doi: 10.1186/1471-2164-15-318
- Guendouze, A., Plener, L., Bzdrenga, J., Jacquet, P., Remy, B., Elias, M., et al. (2017). Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors. *Front. Microbiol.* 8:227. doi: 10.3389/fmicb.2017.00227
- Hamad, M. A., Zajdowicz, S. L., Holmes, R. K., and Voskuil, M. I. (2009). An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Gene* 430, 123–131. doi: 10.1016/j.gene.2008.10.011
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007–3017.
- Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E., et al. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* 34, 1082–1093. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01672.x
- Hense, B. A., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., and Kreft, J. U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 230–239.
- Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Emerson, J., Houston, L. S., Burns, J. L., Ramsey, B. W., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 8, 66–70. doi: 10.1016/j.jcf.2008.09.006
- Howe, T. R., and Iglewski, B. H. (1984). Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect. Immun.* 43, 1058–1063.
- Kummerli, R., Griffin, A. S., West, S. A., Buckling, A., and Harrison, F. (2009). Viscous medium promotes cooperation in the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 3531–3538. doi: 10.1098/rspb.2009.0861
- Lai, B. M., Yan, H. C., Wang, M. Z., Li, N., and Shen, D. S. (2018). A common evolutionary pathway for maintaining quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* 56, 83–89. doi: 10.1007/s12275-018-7286-1
- Lee, J., and Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., et al. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2833–2838. doi: 10.1073/pnas.0511100103
- Mellbye, B., and Schuster, M. (2011). The sociomicrobiology of antivirulence drug resistance: a proof of concept. *mBio* 2:e00131-11. doi: 10.1128/mBio.00131-11
- Muller, M., and Merrett, N. D. (2014). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to ionic silver. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5492–5499. doi: 10.1128/AAC.03069-14
- Mund, A., Diggle, S. P., and Harrison, F. (2017). The fitness of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal cheats is influenced by the diffusivity of the environment. *mBio* 8:e00353-17. doi: 10.1128/mBio.00353-17
- Mund, A., Kuttler, C., Perez-Velazquez, J., and Hense, B. A. (2016). An age-dependent model to analyse the evolutionary stability of bacterial quorum sensing. *J. Theor. Biol.* 405, 104–115. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.12.021

- Ohman, D. E., Cryz, S. J., and Iglewski, B. H. (1980). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J. Bacteriol.* 142, 836–842.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., and Britigan, B. E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L94–L103. doi: 10.1152/ajplung.00025.2004
- Papenfort, K., and Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89
- Park, S. Y., Heo, Y. J., Choi, Y. S., Deziel, E., and Cho, Y. H. (2005). Conserved virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* are required for killing *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* 43, 443–450.
- Popat, R., Cornforth, D. M., McNally, L., and Brown, S. P. (2015). Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria. *J. R. Soc. Interface* 12:20140882. doi: 10.1098/rsif.2014.0882
- Rada, B., and Leto, T. L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol.* 21, 73–81. doi: 10.1016/j.tim.2012.10.004
- Ramos, I., Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., and Newman, D. K. (2010). Phenazines affect biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in similar ways at various scales. *Res. Microbiol.* 161, 187–191. doi: 10.1016/j.resmic.2010.01.003
- Rezzoagli, C., Wilson, D., Weigert, M., Wyder, S., and Kummerli, R. (2017). Probing the evolutionary robustness of anti-virulence treatments targeting iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/195974
- Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M., and Schuster, M. (2007). Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15876–15881. doi: 10.1073/pnas.0705653104
- Saucedo-Mora, M. A., Castañeda-Tamez, P., Cazares, A., Perez-Velazquez, J., Hense, B. A., Cazares, D., et al. (2017). Selection of functional quorum sensing systems by lysogenic bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 8:1669. doi: 10.3389/fmicb.2017.01669
- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A., et al. (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 53, 841–853. doi: 10.1099/jmm.0.45617-0
- Smalley, N. E., An, D., Parsek, M. R., Chandler, J. R., and Dandekar, A. A. (2015). Quorum sensing protects *Pseudomonas aeruginosa* against cheating by other species in a laboratory coculture model. *J. Bacteriol.* 197, 3154–3159. doi: 10.1128/JB.00482-15
- Sun, S., Tay, Q. X., Kjelleberg, S., Rice, S. A., and McDougald, D. (2015). Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 9, 1812–1820. doi: 10.1038/ismej.2014.265
- Vallet-Gely, I., Lemaitre, B., and Boccard, F. (2008). Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 302–313. doi: 10.1038/nrmicro.1870
- Wang, M., Schaefer, A. L., Dandekar, A. A., and Greenberg, E. P. (2015). Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 2187–2191. doi: 10.1073/pnas.1500704112
- Wang, Y., Kern, S. E., and Newman, D. K. (2010). Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer. *J. Bacteriol.* 192, 365–369. doi: 10.1128/JB.01188-09
- Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L., and Newman, D. K. (2011). Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J. Bacteriol.* 193, 3606–3617. doi: 10.1128/JB.00396-11
- Xavier, J. B., Kim, W., and Foster, K. R. (2011). A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 79, 166–179. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07436.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Castañeda-Tamez, Ramírez-Peris, Pérez-Velázquez, Kuttler, Jalalimanesh, Saucedo-Mora, Jiménez-Cortés, Maeda, González, Tomás, Wood and García-Contreras. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Selection of Functional Quorum Sensing Systems by Lysogenic Bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*

Miguel A. Saucedo-Mora^{1†}, Paulina Castañeda-Tamez^{1†}, Adrián Cazares^{2†}, Judith Pérez-Velázquez^{3,4}, Burkhard A. Hense^{3‡}, Daniel Cazares⁵, Wendy Figueroa², Marco Carballo², Gabriel Guarneros², Berenice Pérez-Eretza¹, Nelby Cruz², Yoshito Nishiyama⁶, Toshinari Maeda⁶, Javier A. Belmont-Díaz⁷, Thomas K. Wood⁸ and Rodolfo García-Contreras^{1*}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, ² Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico, ³ Institute of Computational Biology, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Neuherberg, Germany, ⁴ Mathematical Modeling of Biological Systems, Zentrum Mathematik, Technical University of Munich, Garching, Germany, ⁵ Centro de Ciencias Genómicas, National Autonomous University of Mexico, Cuernavaca, Mexico, ⁶ Department of Biological Functions Engineering, Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu, Japan, ⁷ Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico City, Mexico, ⁸ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Pennsylvania State University, University Park, PA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Claudio Fabricio Gonzalez,
University of Florida, United States

Reviewed by:

Cory J. Krediet,
Eckerd College, United States
Marcelo Luciano Merli,
National University of Rosario,
Argentina

*Correspondence:

Rodolfo García-Contreras
rgarc@bq.unam.mx

† These authors have contributed
equally to this work.

‡ Deceased

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 28 June 2017

Accepted: 17 August 2017

Published: 31 August 2017

Citation:

Saucedo-Mora MA, Castañeda-Tamez P, Cazares A, Pérez-Velázquez J, Hense BA, Cazares D, Figueroa W, Carballo M, Guarneros G, Pérez-Eretza B, Cruz N, Nishiyama Y, Maeda T, Belmont-Díaz JA, Wood TK and García-Contreras R (2017) Selection of Functional Quorum Sensing Systems by Lysogenic Bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 8:1669. doi: 10.3389/fmicb.2017.01669

Quorum sensing (QS) in *Pseudomonas aeruginosa* coordinates the expression of virulence factors, some of which are used as public goods. Since their production is a cooperative behavior, it is susceptible to social cheating in which non-cooperative QS deficient mutants use the resources without investing in their production. Nevertheless, functional QS systems are abundant; hence, mechanisms regulating the amount of cheating should exist. Evidence that demonstrates a tight relationship between QS and the susceptibility of bacteria against the attack of lytic phages is increasing; nevertheless, the relationship between temperate phages and QS has been much less explored. Therefore, in this work, we studied the effects of having a functional QS system on the susceptibility to temperate bacteriophages and how this affects the bacterial and phage dynamics. We find that both experimentally and using mathematical models, that the lysogenic bacteriophages D3112 and JBD30 select QS-proficient *P. aeruginosa* phenotypes as compared to the QS-deficient mutants during competition experiments with mixed strain populations *in vitro* and *in vivo* in *Galleria mellonella*, in spite of the fact that both phages replicate better in the wild-type background. We show that this phenomenon restricts social cheating, and we propose that temperate phages may constitute an important selective pressure toward the conservation of bacterial QS.

Keywords: public goods, social cheating, phage therapy, quorum sensing, virulence

INTRODUCTION

Bacterial quorum sensing (QS) coordinates the expression of cooperative behaviors including the production of costly exoproducts like exoenzymes and siderophores (Popat et al., 2015). This benefits neighbor cells in the population whether they invested in their production or not; hence, these exoproducts are public goods. Given that the production of public goods is costly, individuals

that take advantage of them without contributing to their production are social cheaters (Diggle et al., 2007) with the potential to invade the population, causing a tragedy of the commons, which eventually can lead to an extinction of public good producers (Sandoz et al., 2007). However, in nature, QS systems regulating public goods are widespread and conserved among several bacterial species. Therefore, mechanisms that counteract the effects of social cheaters should exist.

One mechanism to reduce cheating is growth of bacteria in environments that promote the physical separation of cooperators and cheaters, decreasing the cheater's fitness (Hense et al., 2007; Mund et al., 2016). This occurs in highly viscous medium that limits diffusion of public goods (Kummerli et al., 2009). Other known mechanisms that limit cheating are growth under the stress created by compounds such as H₂O₂ (García-Contreras et al., 2015) and HCN (Wang et al., 2015) that select the cooperators. Moreover, predation by the protist *Tetrahymena pyriformis* strongly selects the QS wild-type phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*, likely due to the impact of QS on aggregation and biofilm formation (Friman et al., 2013).

A common source of stress for bacteria is the challenge of bacteriophages, which are by far the most abundant biological entities, surpassing bacterial populations by a factor of 10 (Chibani-Chennoufi et al., 2004). Evidence that QS signaling may be involved in regulating the response to phages is increasing. For example, *Escherichia coli* is able to sense QS signals produced by other bacterial species (Michael et al., 2001). In the presence of QS signals, *N*-acyl-L-homoserine lactones, the bacterium significantly reduces the number of phage receptor LamB (Hoyland-Kroghsbo et al., 2013), which protects it against the attack of the λ phage. A similar phenomenon occurs in *Vibrio anguillarum*, since mutants that are permanently locked in a high-cell density state are almost completely immune to the phage KVP40, due the QS-mediated downregulation of the OmpK receptor used by the phage (Tan et al., 2015). This phenomenon contributes to a higher phage attachment and greater killing of the QS mutant locked in a low-cell density state (Tan et al., 2015). Similarly, in *Vibrio cholerae*, it was recently shown that QS protects it against the attack of lytic bacteriophages like JSF35 also by downregulating the phage receptor (LPS O-antigen) and by upregulating the expression of the hemagglutinin protease HAP (Hoque et al., 2016).

For *P. aeruginosa*, an important Gram-negative opportunistic pathogen, it was recently shown that QS decreases infection by the lytic phages K5 and C11 (Qin et al., 2016). However, the lytic phage PT7 decreases the *P. aeruginosa* wild-type population density more than that of an isogenic *lasR* mutant (Mumford and Friman, 2017) yet, the presence of an active *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) QS system allows *P. aeruginosa* to grow better in the presence the lytic phages PT7 and 14/1 (Moreau et al., 2017).

Since all the previously mentioned studies were done with lytic phages, we studied here for the first time the differences in the susceptibility of a *P. aeruginosa* wild-type and a QS mutant to the infection of two temperate phages D3112 and JBD30 as well as the ability of those phages to interfere with the sociomicrobiology of *P. aeruginosa* by selecting strains with active QS systems.

We demonstrate that despite the fact that these bacteriophages replicate more efficiently in QS-proficient strains, the presence of temperate phage leads to the selection of functional QS systems both *in vitro* (counteracting social cheating) and *in vivo* (using *Galleria mellonella*) and that this *in vivo* selection of strains with functional QS systems increases their virulence toward *G. mellonella*. Additionally, our results suggest that QS systems are required for efficient phage production during infection.

RESULTS

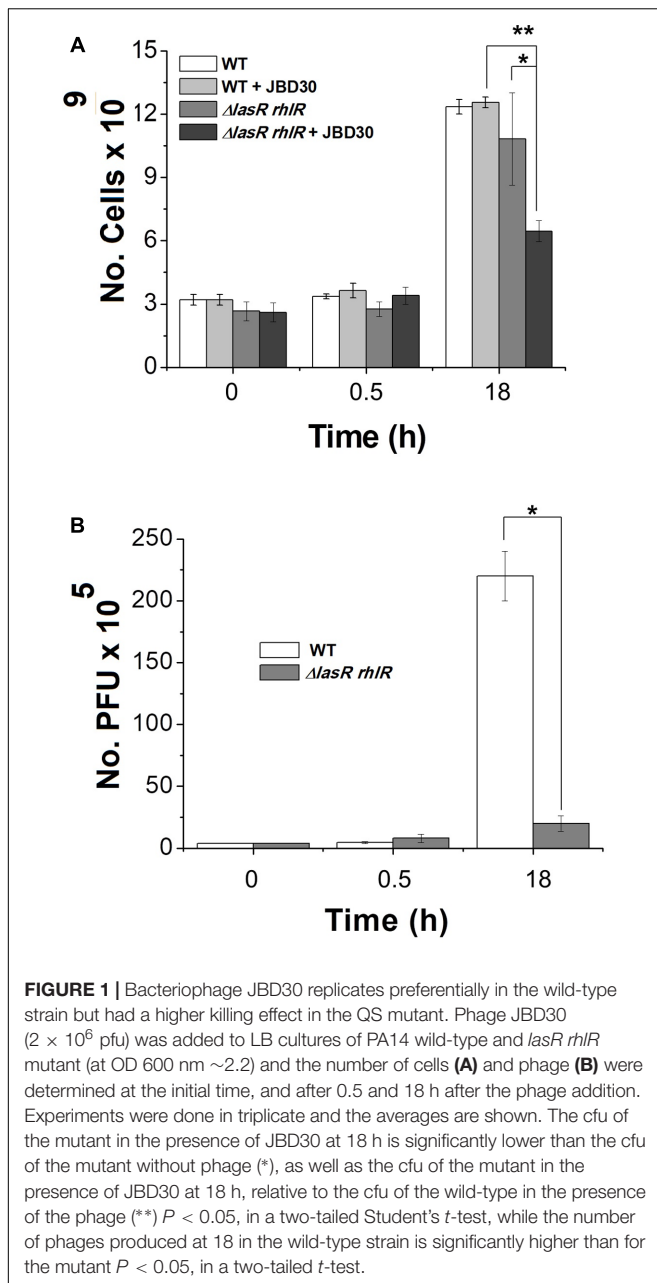
D3112 and JBD30 Phage Production Is More Efficient on QS Proficient Strains

D3112 and JBD30 transposable phages were used for this study because they belong to the group D3112 viruses, one of the most ubiquitous groups of *P. aeruginosa* temperate phages (Cazares et al., 2014). We first tested the infection capacity of D3112 and JBD30 on bacterial lawns of the PA14 strain and its QS-defective mutant. In both cases, a greater number of lytic plaques were observed for the PA14 strain as compared to the QS mutant. Phages D3112 and JBD30 produced, in the wild-type strain, about 2.79-fold and 3.28-fold the number of lytic plaques was observed in the mutant, respectively. Accordingly, we observed a tenfold higher phage production of JBD30 on the PA14 strain versus the QS-defective mutant in liquid cultures after 18 h of phage addition, while no change was observed after 30 min (Figure 1B). These results show that phage production is more efficient in the wild-type strain and suggest that QS system is required for optimal phage development during infection. Interestingly, JBD30 exerted a significant negative effect on the cell viability of the QS mutant despite that its production of viral particles was poor compared to that observed on the wild-type counterpart after 18 h while no change was observed after 30 min of page addition (Figure 1A).

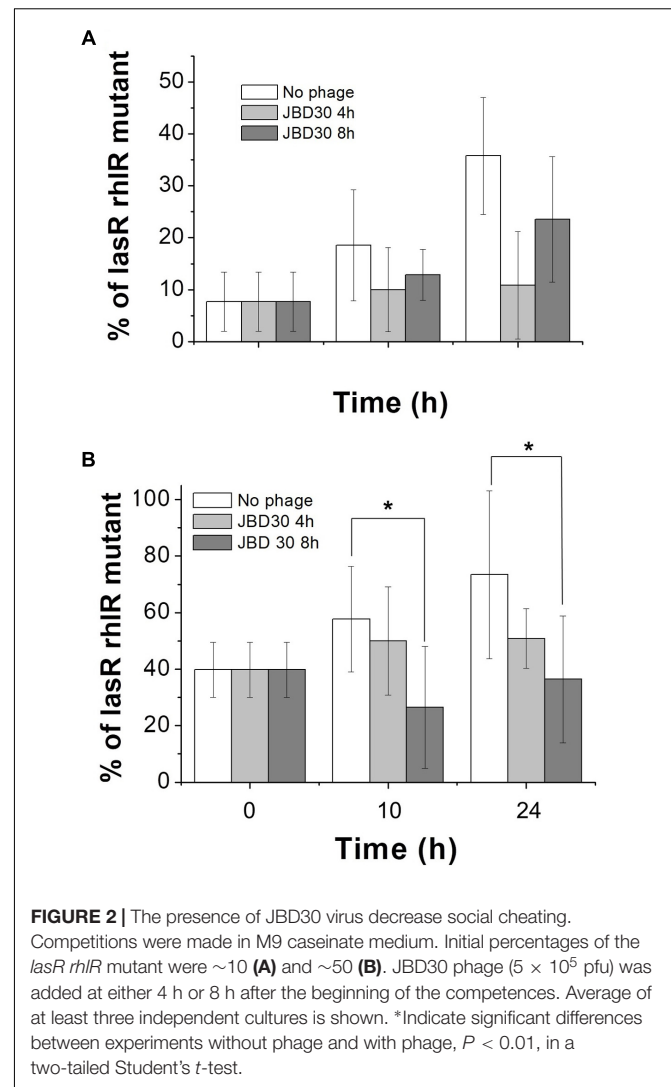
Selection of Strains with Active QS Systems by Phages D3112 and JBD30 *in Vitro*

Since previous findings relative to the influence of QS in phage infections are based on lytic phage (Tan et al., 2015; Qin et al., 2017), we wanted to test if the presence of the temperate phage could influence competition between the wild-type strain and the QS-deficient mutant. First, the competition experiments were conducted in M9 medium with 1% casamino acids as the carbon source without phage, and it was found that the QS mutant is slightly selected, likely because the QS-deficient mutant does not have the metabolic burden of producing QS products. In contrast, the addition of D3112 or JBD30 bacteriophage selected the wild-type strain after 24 h of co-cultivation (Supplementary Figure S1).

Additional competition experiments were made in the same medium but supplemented with 0.25% sodium caseinate as the sole carbon source, a condition promoting social cheating. Under this condition, the only way QS-deficient mutants can grow is by using the amino acids and peptides produced



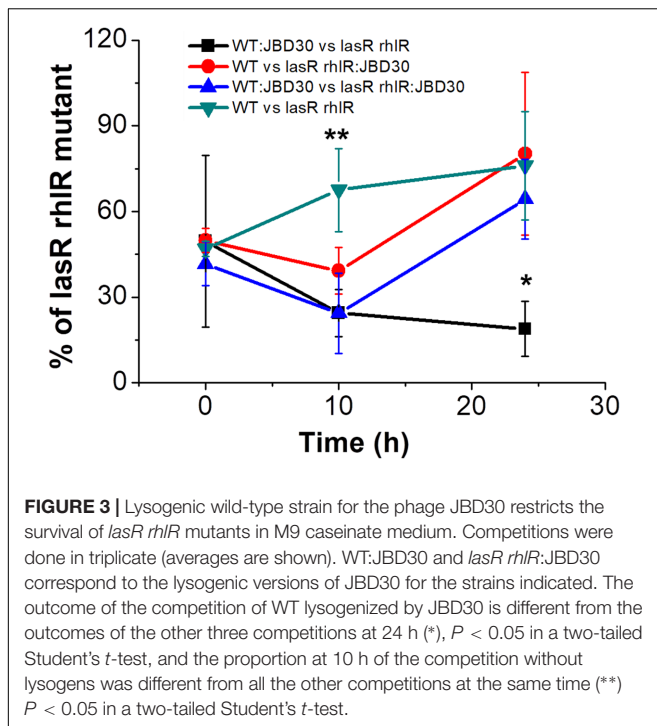
by the caseinate hydrolysis mediated by the QS-controlled exoprotease production by the wild-type. Our results confirmed that under such conditions and in the absence of phage, the QS deficient phenotype is selected. However, regardless of the initial proportion of QS-deficient mutant used (10 or 50%), the addition of bacteriophage JBD30 selected the wild-type QS phenotype and limited social cheating (Figure 2 and Supplementary Material, Figures SM1 and SM2 in the Data Sheet/Mathematical Models). Corroborating our experimental results, the mathematical model showed that the net outcome with respect to the balance between the *lasR rhIR* mutant and wild-type depends not only on public goods production and the level of protection against phages but also on the phages concentration which dynamically changes over



time (Supplementary Figure SM2). In addition, experimental tests performed with D3112 showed a similar trend (data not shown).

QS-Proficient Strain Lysogenized with JBD30 Is Less Prone to Be Exploited by QS-Deficient Mutants

Due to the temperate nature of the phages used in the experiments, we decided to explore the impact of lysogeny on the QS selection by making competitions using lysogenic populations. When lysogenic clones of the wild-type (WT:JBD30) strain infected by JBD30 were competed against the non-lysogen *lasR rhIR* mutant, the presence of the phage carried by the wild-type host allowed it to significantly decrease the number of QS deficient mutants in caseinate medium at 24 h. In contrast, when the phage was carried by the mutant strain (*lasR rhIR*:JBD30) and when the phage was carried by both strains (WT:JBD30 vs *lasR rhIR*:JBD30), no differences were found relative to the



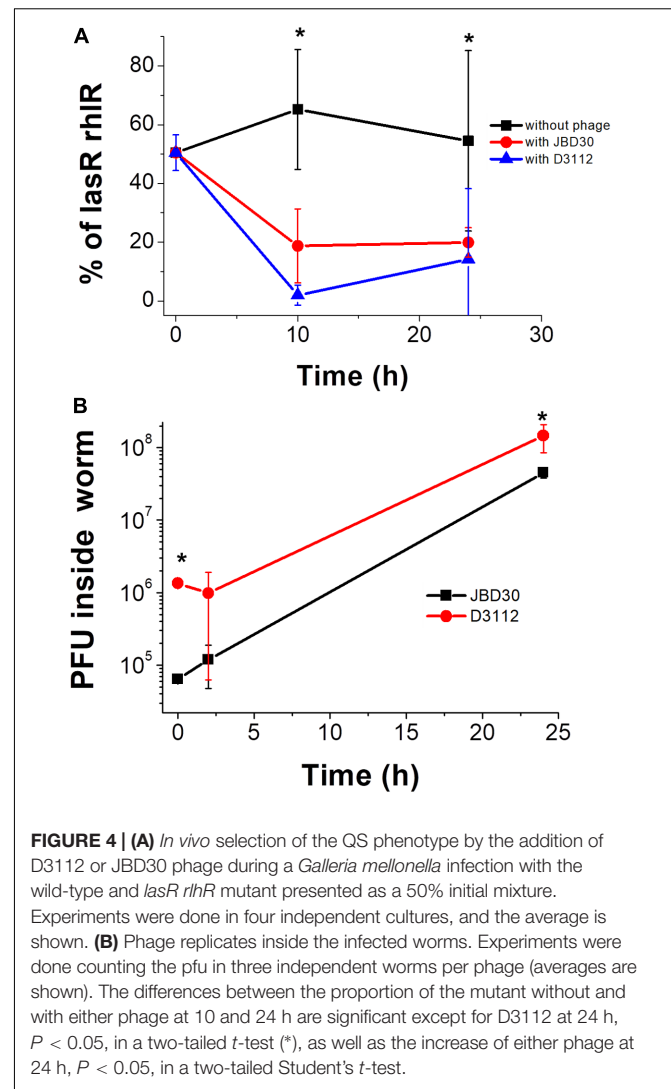
competition in the absence of a lysogenic strain (WT vs *lasR rhIR*) after 24 h; i.e., when there was no phage present (Figure 3).

Selection of Strains with an Active QS System by D3112 and JBD30 Bacteriophages *in Vivo*

After demonstrating the *in vitro* QS selection by the two phages, D3112 and JBD30, their effect *in vivo* was evaluated using the *G. mellonella* infection model. For these experiments, a mixture of 50% wild-type and *lasR rhIR* mutant (~50 total cfu) was inoculated into the larvae, and immediately after infection, either phage D3112 or JBD30 was added to the larvae (or 0.9% NaCl sterile solution as negative control). Hemolymph samples were taken at 10 and 24 h after the addition of the phage and the number of bacteria and phage were determined. The percentages of both strains as a function of time revealed that the addition of these phages strongly selected for the presence of the QS system *in vivo* (Figure 4A). In addition, the plaque forming units (pfu) determination from the hemolymph (at the beginning, 2 and 24 h after phage addition) confirmed an active phage infection inside the larvae since phage titers increased (Figure 4B).

QS Selection by Bacteriophage Increases Virulence with *G. mellonella*

Since QS enhances *P. aeruginosa* virulence in diverse animal models (Wu et al., 2004; Papaioannou et al., 2013; Castillo-Juárez et al., 2015) and we found that bacteriophages select for active QS systems *in vivo* (Figure 4A), we decided to test if this selection could also increase virulence toward *G. mellonella*. As expected, a 100-fold lower initial inoculation of the wild-type strain compared to the QS mutant was required to yield similar



death curves (Supplementary Figure S2), corroborating that the wild-type strain was much more virulent than the mutant. Then, when we inoculated a 50% mixture of both strains (~8 cfu, determined by cfu counting), and 8 h after infection, phage JBD30 (~ 4×10^5 pfu) or saline solution, were added, and we found that larvae death was accelerated by the addition of the bacteriophage (Supplementary Figure S3). Hence, the *in vivo* selection of QS by JBD30 can be related to the increased bacterial virulence.

JBD30 Phage Preferentially Attach to the *lasR rhIR* Mutant

Since previous studies had shown that in *E. coli* and *V. anguillarum* QS proficient strains downregulate phage attachment at high cell densities (Hoyland-Kroghsbo et al., 2013; Tan et al., 2015; Hoque et al., 2016), we performed phage attachment assays for both the wild-type and QS-mutant strains using JBD30. Our results showed that the phage attached preferentially to the QS mutant in LB only at high density (OD 600 nm ~2.2) with 76 ± 3.3 and $57 \pm 3.6\%$ of the

phage adsorbed by the mutant and wild-type, respectively (Supplementary Figure S4A). In contrast, preferential attachment to the QS mutant was not observed in LB low density cultures (OD 600 nm ~0.5) reinforcing the idea that QS mediates the decrease in phage adsorption observed in the wild-type strain (Supplementary Figure S4B).

DISCUSSION

Our results demonstrate that bacteriophages are able to select strains with functional QS systems and show that phage interactions with QS-deficient cells produce negative effects for both phage replication and bacterial survival. Recent reports in different bacterial species show that QS can control anti-phage defense mechanisms leading to lower susceptibility to phage infection in QS-proficient cells (Aaron et al., 2004; Tan et al., 2015; Hoque et al., 2016). In such scenarios, the selection of functional QS systems could be possible due the reduced ability of the phage to infect cells carrying active systems (although this has not been experimentally explored yet); however, we observe the opposite behavior in our model; i.e., phages infect more efficiently the wild-type strain as compared to the QS-mutant. The preferential attachment of the JBD30 phage to the QS mutant may be due to a higher expression of the phage receptor as it has been observed for *V. anguillarum* (Tan et al., 2015). The receptor in the case of D3112 phages (including JBD30) is the type IV pili (Tfp) (Wang et al., 2004). However, it has been reported that Tfp expression in the *lasR rhIR* mutant of the PAO1 strain is similar to the expression in the wild-type (Beatson et al., 2002), and we found that Tfp-dependent twitching motility was the same for the PA14 wild-type strain and the QS-mutant (data not shown). Hence, the higher susceptibility of the QS-deficient strain for phage adsorption is likely not due to a higher Tfp expression. Other specific molecular phenomena, such as the higher synthesis of QS-controlled capsule components, might be a factor in decreasing phage attachment toward QS proficient individuals. In agreement with this hypothesis, the surface hydrophobicity of the wild-type strain is much higher than that of the mutant and it decreases by the treatment of alginate lyase (data not shown). Whether this feature is related to the phage adsorption rate or QS selection observed in our experiments has yet to be tested.

Due to the temperate nature of the phages used in our experiments, lysogeny represents an alternative explanation for the selection of QS systems. It was recently reported that temperate LES phages can increase the competitiveness of *P. aeruginosa* lysogens against their non-lysogenic version (Davies et al., 2016). In that study, the authors demonstrate that lysogens invade the phage-susceptible population during competition experiments in a rat chronic lung infection model (Davies et al., 2016). Our findings add to this result by showing that during infection, temperate bacteriophages may maintain cooperative behavior by eliminating QS-deficient social cheaters that lack the phages. In contrast, if the QS-deficient mutant contains the temperate phage at the beginning of the competition with a non-lysogenic wild-type host, the proportions at 24 h

do not significantly change relative to the conditions without phage. As expected, when both strains carried the phage from the beginning of the competition, the mutant proportions increased at 24 h since the QS mutant is now protected from phage attack and can exploit the wild-type as in the no phage control (Figure 3). Since our results indicate that phage infection is more efficient in the QS-proficient strain, it is likely that a greater number of lysogens is produced in this genetic background compared to the mutant version. Hence we speculate that a greater rate of wild-type lysogenization and phage production compromise the survival of the QS-defective strain during *in vitro* and *in vivo* competitions, thus leading to the selection of QS active systems. The mechanisms affecting the phage production in the QS-deficient strain remain to be elucidated; yet, it is intriguing to observe such behavior in spite the phage preference for adsorption to the mutant cells. These results might imply a phage dependence on QS-regulated molecular mechanisms for its optimal replication or reflect the fragility of the QS defective bacteria in sustaining phage infections.

In addition to maintaining active QS systems, our results with bacteriophages also have important implications for the effectiveness of compounds used to reduce pathogenesis by masking QS; i.e., quorum-quenching (QQ) compounds. First, our results agree with the observation that in the *P. aeruginosa*, QS-defective population, i.e., in the *lasR rhIR* mutant that mimics a strain that has QS inhibited completely when QQ compounds are used, these cells are much more sensitive to environmental stress than the wild-type strain with its functional QS system (García-Contreras et al., 2015; García-Contreras, 2016). This has been shown for heat shock, heavy metal exposure and oxidative stress, and the addition of H₂O₂, all of which select the QS-proficient phenotype during growth on casein as the sole carbon source (García-Contreras et al., 2015). Given that bacteriophages are omnipresent in the natural environments of bacteria (Chibani-Chennoufi et al., 2004), we propose that broad sources of environmental stress in addition to spatial structure could promote the selection of QS-proficient bacteria (García-Contreras et al., 2016); i.e., the QQ resistant population, when QQ compounds are used. Critically, our results with bacteriophages demonstrate that although cheating may prevent the selection and spread of QS-proficient individuals (i.e., those bacteria resistant to QQ compounds) under ideal growth conditions (Mellbye and Schuster, 2011; Gerdt and Blackwell, 2014), the higher susceptibility of QS-deficient mutants in the presence of bacteriophages allows the selection and maintenance of a functional QS system; i.e., the presence of bacteriophages, promotes selection of QQ resistant bacteria.

The current global antibiotic resistance crisis has generated a resurgence of interest in phage therapy in Western medicine (Young and Gill, 2015). Young and Gill (2015) in pointed out that a deeper ecological understanding of bacteria-phage interactions is a requirement to develop and establish successful phage therapy treatments (Young and Gill, 2015). Since many virulence factors are QS controlled, exploring the role of QS is the obvious next step in advancing this goal. To date, it is known that bacterial isolates from chronic infections tend to show

genetic variability within the same host (Wilder et al., 2009). In *P. aeruginosa* infections, *lasR* mutants accumulate accompanied by a lowered mean virulence (Ciofu et al., 2010; Hogardt and Heesemann, 2013). Critically, a certain, albeit sometimes small fraction of strains with intact genes seem to always remain (Wilder et al., 2009). CF patients with chronic *P. aeruginosa* infections are prone to periods of severe exacerbation, for which the cause yet remains unknown. New infections by more virulent *P. aeruginosa* strains and the influence of temperate phages have been dismissed as possible causes (Aaron et al., 2004; James et al., 2015). Reports about negative effects during clinical phage therapies are rare, but exist (Sulakvelidze et al., 2001). In view of our results, the shifts in virulence may be due to the complex interactions of the pathogen with its phages. Our results also suggest that a strategy to cope with the undesired rise of highly virulent strains after phage addition should be considered when using QS inhibition, for example by testing if the phages alone or in combination (either lytic or temperate) select QS proficient or deficient strains or otherwise do not have any bias in order to avoid the potential risks of selecting more virulent QS proficient strains.

Although lytic phages are the recommended type of viruses for therapeutic purposes, the use of temperate phages has been also proposed under certain circumstances (Chung et al., 2012). Our results suggest that even in such circumstances the phage-driven selection of QS active systems could represent a previously unexplored risk.

We further evaluated the potential consequences of our results in regard to phage therapy under such conditions of genetic variability by extending our mathematical model (see Mathematical Modeling Supplement) to include long-term effects in the host. We performed a series of numerical simulations, first assuming host colonization with an initially low fraction of cheaters (10%). Without phages and with a carbon source that requires shared resources, cheaters will begin to out-compete the wild-type due to exploitation of public goods once the latter has reached the QS activation threshold (Figure 5A). Phage therapy will usually start at some time after the patient has developed symptoms of infection; i.e., after induction of QS-induced virulence factors. This can result in the low-virulence, QS mutants being out-competed and an increase of absolute number of wild-type cells, depending on the strength of the interactions (Figure 5B). The fitness benefit of the cheater due to utilization of public goods will probably be lower in the host than in batch culture experiments, as the spatial structuring of bacterial cells (e.g., in the lung) will dampen it (Lam et al., 1980; Nadell et al., 2010). The model is able to display successful therapy, but only after a large dose of phages is applied after activation (Figure 5C). A possible strategy to avoid the undesired promotion of highly virulent strains would be to start phage therapy before the onset of QS induction (Figure 5D). However, this may be difficult to implement in practice as the infection yet remains undetected due to the absence of severe symptoms. Note that parameters determining the net outcome (see model), such as costs of public good production (β_2) and initial phage

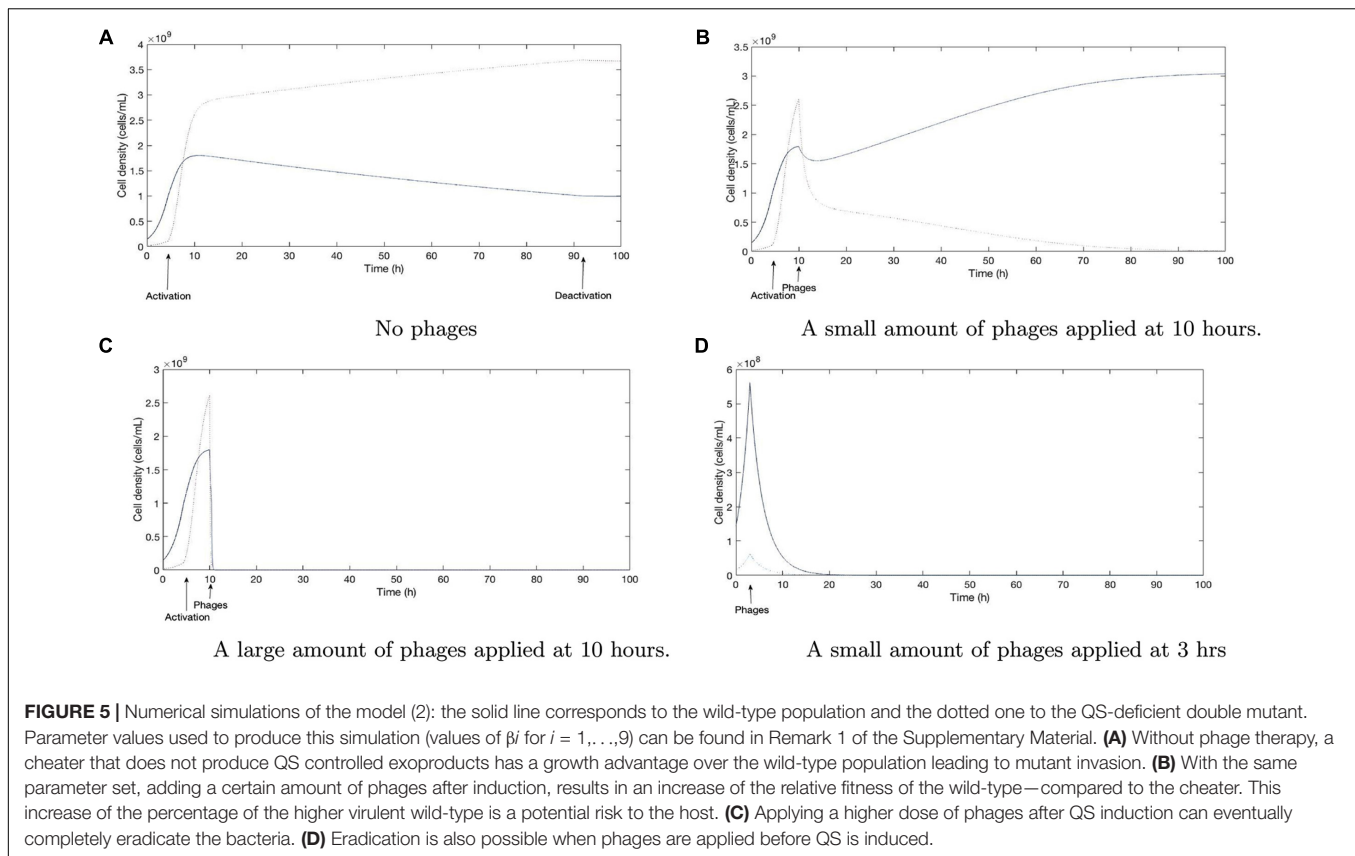
concentration $[V(T_p)]$, can change over time or in dependence on the specific environmental conditions (Mellbye and Schuster, 2014). Additionally, a variety of anti-phage strategies may exist in bacteria. In summary, a patient-specific prediction of the net outcome and thus a quantification of the risk, would be highly complex. We remark here that spatial structuring of the bacterial population probably also impedes complete eradication even if high doses of phages are applied, as phage pressure on cells in deeper layers of colonies and biofilms will be limited (Abedon, 2016). Overall, we predict that phage therapy may constitute a hidden risk of exacerbating the infection by selecting for more virulent strains. Alternatively, a combined application of QS inhibitors and phages can be considered.

Hence, more effort should be dedicated to test the effects of different types of phages in QS selection as well as characterizing the mechanisms involved in the selection of QS-proficient strains. For instance, we need to further investigate the higher susceptibility of the QS-deficient mutant to phage during competitions in spite of the fact that phage infection is more efficient in the wild-type strain. It is remarkable that phage production is reduced in the QS-defective background as compared to the QS-proficient cells; hence, lysis by the phages in the mutant may not always involve a successful infection process. In addition, for temperate phages, the lysogenic potential toward both strains should be taken into account since differences in this regard influence the competition outcome, as we have shown. The results presented here highlight the importance of determining the relative fitness of putative social cheaters not only under a single condition but by taking into account different environmental variables that can severely change the fitness of such cheats (O'Brien and Brockhurst, 2015; Wolf et al., 2015). We demonstrate that the presence of lysogenic bacteriophages act as a powerful driving force for the selection of functional bacterial QS systems both *in vitro* and *in vivo*, by stabilizing bacterial cooperation and therefore virulence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Phages, and Growth Conditions

The *P. aeruginosa* PA14 wild-type strain and the PA14 *lasR rhlR* mutant were provided by Dr. You-Hee Cho from the College of Pharmacy CHA University, South Korea (Park et al., 2005). Pre-cultures of both strains were grown in LB medium aerobically in flasks, at 37°C with 200 rpm shaking for ~16 h. These pre-cultures were used to inoculate flasks with M9 minimal medium supplemented with 0.25% of sodium caseinate as the sole carbon source, and the cultures were grown under the same conditions. Growth was monitored by recording the turbidity (600 nm) with a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu). Bacteriophage D3112 was acquired from the Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses, Canada, and phage JBD30 was kindly provided by Dr. Alan Davison from the University of Toronto, Canada. Phage infection was tested on bacterial lawns of both



strains by using the standard soft agar overlay method (Green and Sambrook, 2001) and recording the number of lytic plaques observed. The infection assays on liquid cultures were carried out on LB medium. PA14 and its derivative mutant were grown on 5 ml at 37°C with 200 rpm shaking for 10 h. At this point, 2×10^6 pfu of phage JBD30 were added and the cultures were grown under the same conditions until 18 h where samples were taken to count the viable cells and phage produced.

Competition Experiments

Cultures in M9 caseinate or M9 casamino acids medium were inoculated at an initial turbidity at 600 nm of ~ 0.05 with different proportions of the PA14 wild-type and the QS mutant by mixing the pre-cultures and by growing under the conditions detailed above. Samples of each culture were taken at different cultivation times and were used to isolate colonies. The colonies were then transferred to LB plates with 3% skim milk to determine their exoprotease production to quantify the proportion of the two populations.

For analyzing the effect of bacteriophages on competitions between the wild-type and QS-deficient strains, we tested the temperate phages D3112 and JBD30. Approximately 2×10^3 pfu of each phage were added at 4 or 8 h during the competition experiments, and subsequent samples were taken to estimate the proportion of the two populations.

Lysogens were obtained by exposing wild-type and *lasR rhIR* mutant liquid cultures to infection by phages JBD30 and D3112. Survivor colonies were obtained, purified, and tested for their phage production by spotting their cell-free supernatants on wild-type lawns, and for their immunity against phages JBD30 or D3112. In addition, PCR reactions were performed by using primers (F: 5'-GATACCTGACCCGCAACGG-3' and R: 5'-AGATGCCGATGGGGATCAGT-3') targeting a conserved region of the D3112 and JBD30 genomes to confirm the presence of the phages in the bacterial genome. Competitions using these lysogens were done as explained above for non-lysogenic bacteria.

For the *in vivo* competition experiments, cells were taken from LB overnight cultures and mixtures of approximate 1:1 ratio of the wild-type and *lasR rhIR* mutant were made, then the mixtures were diluted with 0.9% sterile NaCl solution and ~ 50 viable bacteria of each mixture (estimated by cfu determination) were injected into the larvae, in the absence and presence of either D3112 or JBD30 phage, which were administrated immediately after the bacteria by injecting them diluted in 0.9% sterile NaCl at $\sim 9 \times 10^5$ and $\sim 6 \times 10^4$ pfu per larvae, respectively. Samples of the hemolymph (~ 3 ml) were taken after 10 and 24 h to determine the proportion of wild-type and mutant strain, and after 2 and 24 h of inoculation to determine the number of phages.

Virulence Test

The virulence of individual strains and strain mixtures against *G. mellonella* (last instar larvae) was tested by injecting different dilutions (made in 0.9% sterile NaCl solution) of LB cultures of wild type and *lasR rhlR* mutant strains using overnight LB cultures, and the approximate number of bacteria inoculated was estimated by cfu determination and virulence was evaluated by assessing *G. mellonella* survival daily. Experiments were done using at least 10 larvae per condition.

Phage Adsorption

Phage adsorption of JBD30 to the wild-type and mutant strains was tested on cultures at the logarithmic and stationary phase by following a modified version of a previously reported protocol (Roncero et al., 1990). Cells in the logarithmic and stationary phase were taken at turbidity at 600 nm of ~ 0.5 and ~ 2 , respectively. Cells taken from both growth phases were adjusted to turbidity of 2.2, and 200 μ l were mixed with an equal volume of modified phage buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, and 0.01% gelatine) containing 1×10^4 pfu. CaCl₂ (5 mM) was added to the mix, and it was incubated for 10 min at 37°C. Bacteria were removed from the mix by centrifugation at 9300 g for 15 min, and the supernatants were treated with chloroform. Phage was quantified using the soft agar overlay method with bacterial lawns of the PA14 strain. Reduction in the initial number of pfu was considered as the fraction of viral particles bound to the bacterial cells.

Surface Hydrophobicity

This phenotype was determined by estimating the percentage of cells transferred from an aqueous to a hydrophobic hexadecane (Sigma) phase using overnight LB cultures (García-Lara et al., 2015) with and without alginate lyase (Sigma) at 1 mg/ml.

Statistical Analysis

All experiments were done at least in triplicate; values are expressed as mean \pm SD. Statistical significance for **Figures 1–4** were evaluated by a two-tailed Student's *t*-test. Plots and their analysis were done using the SPSS and the Origin 8.0 software.

Mathematical Modeling

Two mathematical models were developed, each consisting of sets of ordinary differential equations. The first one focused in estimating the impact of QS-regulated phage protection on the relative fitness of the wild-type strain relative to the QS-deficient strain. The purpose of the model was first to test the validity of the conclusions from the competition experiments by comparing the time course obtained in experiments with the model's solutions

obtained numerically (solving the equations); i.e., simulations, and second to get a rough estimation about the strength of these fitness effects. For more details, see mathematical modeling supplement. This model involved time-dependent parameters. The second model was developed to explore the long-term effect in the host. To this end, an equation to explicitly account for the dynamics of the phages was added. This model involved density-dependent parameters to account for QS-based activation. The details of the modeling framework of both models can be found in the Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS-M, PC-T, AC, DC, WF, MC, BP-E, NC, and YN performed the experiments. JP-V and BH made the mathematical modeling. AC, JP-V, BH, GG, TM, TW, and RG-C conceived the study. AC, JP-V, BH, TM, TW, and RG-C wrote the manuscript. JB-D and PC-T analyzed the data.

FUNDING

We were supported by grants from CONACYT Problemas Nacionales 2015-01-402 and PAPIIT UNAM no. RA201116 to R-GC, by SEP/CONACYT-Mexico no. 166814 to GG, and by the Army Research Office (W911NF-14-1-0279) to TW. TW is the Biotechnology Endowed Chair at the Pennsylvania State University.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper is dedicated to the memory of our friend and colleague Prof. Burkhard Hense who actively participated in its conception and whose contributions to theoretical microbiology were outstanding. We thank Dr. You-Hee Cho from the College of Pharmacy CHA University, South Korea for providing the PA14 strains. We thank Prof. Alan Davison from the University of Toronto for providing us the JBD30 phage. R-GC is grateful with Miss Beatriz Meráz Rios for her technical assistance to perform some of the experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01669/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aaron, S. D., Ramotar, K., Ferris, W., Vandemheen, K., Saginur, R., Tullis, E., et al. (2004). Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 811–815. doi: 10.1164/rccm.200309-1306OC
- Abedon, S. T. (2016). Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: phage preference for less mature targets? *FEMS Microbiol. Lett.* 363:fnv246. doi: 10.1093/femsle/fnv246
- Beaton, S. A., Whitchurch, C. B., Semmler, A. B., and Mattick, J. S. (2002). Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184, 3598–3604. doi: 10.1128/JB.184.13.3598-3604.2002

- Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E. A., Tomas, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S. J., et al. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J. Clin. Cases* 3, 575–598. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.575
- Cazares, A., Mendoza-Hernandez, G., and Guarneros, G. (2014). Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages. *BMC Genomics* 15:1146. doi: 10.1186/1471-2164-15-1146
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M. L., and Brussow, H. (2004). Phage-host interaction: an ecological perspective. *J. Bacteriol.* 186, 3677–3686. doi: 10.1128/JB.186.12.3677-3686.2004
- Chung, I. Y., Sim, N., and Cho, Y.-H. (2012). Antibacterial efficacy of temperate phage-mediated inhibition of bacterial group motilities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5612–5617. doi: 10.1128/AAC.00504-12
- Ciofu, O., Mandsberg, L. F., Bjarnsholt, T., Wassermann, T., and Hoiby, N. (2010). Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *muA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology* 156, 1108–1119. doi: 10.1099/mic.0.033993-0
- Davies, E. V., James, C. E., Kukavica-Ibrulj, I., Levesque, R. C., Brockhurst, M. A., and Winstanley, C. (2016). Temperate phages enhance pathogen fitness in chronic lung infection. *ISME J.* 10, 2553–2555. doi: 10.1038/ismej.2016.51
- Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S., and West, S. A. (2007). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450, 411–414. doi: 10.1038/nature06279
- Friman, V. P., Diggle, S. P., and Buckling, A. (2013). Protist predation can favour cooperation within bacterial species. *Biol. Lett.* 9:20130548. doi: 10.1098/rsbl.2013.0548
- García-Contreras, R. (2016). Is quorum sensing interference a viable alternative to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Front. Microbiol.* 7:1454. doi: 10.3389/fmicb.2016.01454
- García-Contreras, R., Maeda, T., and Wood, T. K. (2016). Can resistance against quorum-sensing interference be selected? *ISME J.* 10, 4–10. doi: 10.1038/ismej.2015.84
- García-Contreras, R., Nunez-López, L., Jasso-Chávez, R., Kwan, B. W., Belmont, J. A., Rangel-Vega, A., et al. (2015). Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. *ISME J.* 9, 115–125. doi: 10.1038/ismej.2014.98
- García-Lara, B., Saucedo-Mora, M. A., Roldan-Sanchez, J. A., Pérez-Eretza, B., Ramasamy, M., Lee, J., et al. (2015). Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Lett. Appl. Microbiol.* 61, 299–305. doi: 10.1111/lam.12456
- Gerdts, J. P., and Blackwell, H. E. (2014). Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria. *ACS Chem. Biol.* 9, 2291–2299. doi: 10.1021/cb5004288
- Green, M. R., and Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hense, B. A., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., and Kreft, J. U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 230–239.
- Hogardt, M., and Heesemann, J. (2013). Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 91–118. doi: 10.1007/82_2011_199
- Hoque, M. M., Naser, I. B., Bari, S. M., Zhu, J., Mekalanos, J. J., and Faruque, S. M. (2016). Quorum regulated resistance of *Vibrio cholerae* against environmental bacteriophages. *Sci. Rep.* 6:37956. doi: 10.1038/srep37956
- Hoyland-Kroghsbo, N. M., Maerkedahl, R. B., and Svenningsen, S. L. (2013). A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *mBio* 4:e362-12. doi: 10.1128/mBio.00362-12
- James, C. E., Davies, E. V., Fothergill, J. L., Walshaw, M. J., Beale, C. M., Brockhurst, M. A., et al. (2015). Lytic activity by temperate phages of *Pseudomonas aeruginosa* in long-term cystic fibrosis chronic lung infections. *ISME J.* 9, 1391–1398. doi: 10.1038/ismej.2014.223
- Kummerli, R., Griffin, A. S., West, S. A., Buckling, A., and Harrison, F. (2009). Viscous medium promotes cooperation in the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Biol. Sci.* 276, 3531–3538. doi: 10.1098/rspb.2009.0861
- Lam, J., Chan, R., Lam, K., and Costerton, J. W. (1980). Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 28, 546–556.
- Mellbye, B., and Schuster, M. (2011). The sociomicrobiology of antivirulence drug resistance: a proof of concept. *mBio* 2:e00131-11. doi: 10.1128/mBio.00131-11
- Mellbye, B., and Schuster, M. (2014). Physiological framework for the regulation of quorum sensing-dependent public goods in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 196, 1155–1164. doi: 10.1128/JB.01223-13
- Michael, B., Smith, J. N., Swift, S., Heffron, F., and Ahmer, B. M. (2001). SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J. Bacteriol.* 183, 5733–5742. doi: 10.1128/JB.183.19.5733-5742.2001
- Moreau, P., Diggle, S. P., and Friman, V. P. (2017). Bacterial cell-to-cell signaling promotes the evolution of resistance to parasitic bacteriophages. *Ecol. Evol.* 7, 1936–1941. doi: 10.1002/ece3.2818
- Mumford, R., and Friman, V. P. (2017). Bacterial competition and quorum-sensing signalling shape the eco-evolutionary outcomes of model in vitro phage therapy. *Evol. Appl.* 10, 161–169. doi: 10.1111/eva.12435
- Mund, A., Kuttler, C., Perez-Velazquez, J., and Hense, B. A. (2016). An age-dependent model to analyse the evolutionary stability of bacterial quorum sensing. *J. Theor. Biol.* 405, 104–115. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.12.021
- Nadell, C. D., Foster, K. R., and Xavier, J. B. (2010). Emergence of spatial structure in cell groups and the evolution of cooperation. *PLoS Comput. Biol.* 6:e1000716. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000716
- O'Brien, S., and Brockhurst, M. A. (2015). Social evolution: slimy cheats pay a price. *Curr. Biol.* 25, R378–R381. doi: 10.1016/j.cub.2015.03.018
- Papaioannou, E., Utari, P. D., and Quax, W. J. (2013). Choosing an appropriate infection model to study quorum sensing inhibition in *Pseudomonas* infections. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 19309–19340. doi: 10.3390/ijms140919309
- Park, S. Y., Heo, Y. J., Choi, Y. S., Deziel, E., and Cho, Y. H. (2005). Conserved virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* are required for killing *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* 43, 443–450.
- Popat, R., Cornforth, D. M., McNally, L., and Brown, S. P. (2015). Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria. *J. R. Soc. Interface* 12:20140882. doi: 10.1098/rsif.2014.0882
- Qin, X., Sun, Q., Yang, B., Pan, X., He, Y., and Yang, H. (2016). Quorum sensing influences phage infection efficiency via affecting cell population and physiological state. *J. Basic Microbiol.* 57, 162–170. doi: 10.1002/jobm.201600510
- Qin, X., Sun, Q., Yang, B., Pan, X., He, Y., and Yang, H. (2017). Quorum sensing influences phage infection efficiency via affecting cell population and physiological state. *J. Basic Microbiol.* 57, 162–170. doi: 10.1002/jobm.201600510
- Roncero, C., Darzins, A., and Casadaban, M. J. (1990). *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophages D3112 and B3 require pili and surface growth for adsorption. *J. Bacteriol.* 172, 1899–1904. doi: 10.1128/jb.172.4.1899-1904.1990
- Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M., and Schuster, M. (2007). Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15876–15881. doi: 10.1073/pnas.0705653104
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. Jr. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 649–659. doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
- Tan, D., Svenningsen, S. L., and Middelboe, M. (2015). Quorum sensing determines the choice of antiphage defense strategy in *Vibrio anguillarum*. *mBio* 6:e00627-15. doi: 10.1128/mBio.00627-15
- Wang, M., Schaefer, A. L., Dandekar, A. A., and Greenberg, E. P. (2015). Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 2187–2191. doi: 10.1073/pnas.15007704112
- Wang, P. W., Chu, L., and Guttman, D. S. (2004). Complete sequence and evolutionary genomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112. *J. Bacteriol.* 186, 400–410. doi: 10.1128/JB.186.2.400-410.2004

- Wilder, C. N., Allada, G., and Schuster, M. (2009). Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect. Immun.* 77, 5631–5639. doi: 10.1128/IAI.00755-09
- Wolf, J. B., Howie, J. A., Parkinson, K., Gruenheit, N., Melo, D., Rozen, D., et al. (2015). Fitness trade-offs result in the illusion of social success. *Curr. Biol.* 25, 1086–1090. doi: 10.1016/j.cub.2015.02.061
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Molin, S., Givskov, M., et al. (2004). Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 1054–1061. doi: 10.1093/jac/dkh223
- Young, R., and Gill, J. J. (2015). MICROBIOLOGY. Phage therapy redux—What is to be done? *Science* 350, 1163–1164. doi: 10.1126/science.aad6791
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Saucedo-Mora, Castañeda-Tamez, Cazares, Pérez-Velázquez, Hense, Cazares, Figueroa, Carballo, Guarneros, Pérez-Eretza, Cruz, Nishiyama, Maeda, Belmont-Díaz, Wood and García-Contreras. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.