



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ESTUDIO DE LA MOTILIDAD EN TRES  
BACTERIAS DEL GÉNERO *VIBRIO* BAJO  
DIFERENTES CONDICIONES DE SALINIDAD”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**LETICIA CRUZ MENDOZA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**



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.

## Hoja de jurado

1. Datos del alumno

Cruz

Mendoza

Leticia

5557675574

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311273878

2. Datos del tutor

Dr.

Francisco Javier

De la Mora

Bravo

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Bertha María Josefina

González

Pedrajo

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Juan Luis

Chávez

Pacheco

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Edén Marcela

Rodríguez

Flores

6. Datos del sinodal 4

Biol.

María Teresa

Rubio

Monroy

7. Datos del trabajo escrito

“Estudio de la motilidad en tres bacterias del género *Vibrio* bajo diferentes condiciones de salinidad”

118p

2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme concluir mis estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias y hacer posible la elaboración de este proyecto en el Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco en memoria de mi asesor de tesis el Dr. Georges Dreyfus Cortés del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por permitirme integrarme al laboratorio y llevar a cabo la asesoría de este presente trabajo.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Al Dr. Francisco Javier de la Mora por asumir el cargo de tutor y sinodal para poder realizar los tramites correspondientes del presente trabajo, así mismo agradezco el tiempo, aprendizaje, paciencia y resolver las dificultades técnicas de los experimentos realizados en el laboratorio.

A la QFB. Teresa Ballado por el apoyo a la resolución de dificultades técnicas y asesoría brindada durante la realización de esta tesis.

A la M. en C. Mariela García Ramos por el invaluable tiempo y asesoría brindada durante la realización de esta tesis.

Agradezco a mis sinodales por todo el apoyo, tiempo y esfuerzo invertidos para la revisión de esta tesis y compartir su conocimiento.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres por su apoyo y tiempo invaluable en todos estos años, el esfuerzo que ponen todos los días para que logre concluir todos mis proyectos en la vida que sin duda alguna me han enseñado a luchar por mis objetivos, ser mejor persona y superar todos los obstáculos en cada uno de mis proyectos personales.

A mis hermanos Guadalupe y Carlos por ser los mejores hermanos, quienes me han apoyado, acompañado y aconsejado a lo largo de toda mi vida.

A mis mejores amigos Josué López, Sandra Madrid, Abraham Barajas, Víctor López, quienes me han demostrado el valor de una amistad verdadera que seguirá por más años y así mismo por escucharme, permitirme escucharlos, compartir sus conocimientos, sueños, estar presentes en eventos importantes para mí y permitirme estar en los suyos. Gracias por el apoyo y los innumerables consejos que me han dado.

A la M. en C. Aida Téllez Velasco y a mis compañeros del Instituto de Biología, Jardín Botánico Viri y Eder por hacer tan amena la estancia en el programa “Jóvenes hacia la investigación”, con sus enseñanzas he aprendido y entendido la importancia de seguir con mis sueños y contar con ustedes en cualquier momento.

A la Dra. Martha Reguero y a mis compañeros del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por el amplio conocimiento en el Servicio Social y permitirme integrarme en el laboratorio de malacología en el mantenimiento e identificación de ejemplares de moluscos, que fue enriquecedor para mi formación académica.

A Javier de la Mora, por sus enseñanzas en el laboratorio, por escucharme, ser la persona más paciente, amable y hacer que mi estadía en el laboratorio fuera agradable con esas pláticas y por el apoyo moral desde el inicio del taller hasta el proceso de titulación.

A mis amigos y compañeros del laboratorio (Mariela, Cindel, Selene, Yael, Adrián y Luz) por esa convivencia amenas dentro del laboratorio, por los intercambios de ideas para enriquecernos como personas. Por todo el apoyo y alegrías que me han brindado durante todo este tiempo en mi estadía en el laboratorio.

A mis amigos de la Facultad (Karla Cassanova, Andrés Arenas, Carlos Navarro, Jessica Orozco, Jair Balansario, Edwin López, Marisol Álvarez, Julieta Vega, Anita, Dianita Gorozpe, Diego Nájera y Raúl).

A mis compañeros y amigos del museo UNIVERSUM, Museo de las Ciencias; (Víctor, Fede, Jorge, Alejandra, Esmeralda, Jacqueline, Quique, Midori, Leslie y Edgar), por ese ambiente de compañerismo y esas buenas charlas e intercambio de pensar de cada uno de ellos y por ser tan ameno el trabajo en el museo.

Finalmente me agradezco a mí por hacer esto posible.

“After climbing a very high mountain,  
We discovered that there are many  
Other mountains to climb”.

*-Nelson Mandela-*

“Equipado con sus cinco sentidos,  
el hombre explora el Universo que lo rodea  
y a sus aventuras las llama Ciencia.”

*Edwin Powell Hubble*

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
Motilidad bacteriana .....	5
Modelos biológicos y experimentales: <i>Vibrio shilonii</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> ....	8
<i>Vibrio shilonii</i> .....	9
<i>Vibrio harveyi</i> .....	13
<i>Vibrio alginolyticus</i> .....	15
Estructura del flagelo .....	16
El filamento .....	17
El gancho .....	20
El cuerpo basal .....	22
El anillo C.....	23
El eje.....	23
El motor .....	24
El rotor .....	25
El estátor .....	25
Generación del torque: interacción entre el estátor y el motor .....	27
Aparato de exportación flagelar tipo III .....	28
Biogenesis flagelar .....	31
Regulación de la biogénesis flagelar .....	33
Quimiotaxis, reorientación y nado sesgado.....	37
2. ANTECEDENTES .....	42
El primer patógeno descrito, y descubrimiento de especies no patógenas dentro del grupo de los vibrios.....	42
3. JUSTIFICACIÓN .....	44
4. HIPÓTESIS .....	46
5. OBJETIVOS.....	46
Objetivo general.....	46

Objetivos particulares .....	46
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
Cepas y medios.....	47
Ensayos de desplazamiento en agar semisólido .....	47
Curvas de crecimiento.....	48
Videos.....	48
Análisis estadístico.....	50
Análisis bioinformático .....	50
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
Alineamientos múltiples de secuencias .....	52
Árboles Filogenéticos de las proteínas PomA y PomB .....	58
Matrices de los alineamientos múltiples de secuencias .....	61
Árbol filogenético con la subunidad 16S ADNr.....	63
Ensayos de nado en medio semisólido .....	64
Medición de diámetros formados por el desplazamiento de las bacterias: <i>Vibrio shilonii</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	67
Curvas de crecimiento de las bacterias: <i>Vibrio shilonii</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	69
Velocidad de nado de las bacterias: <i>Vibrio shilonii</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> ...	72
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
Los dos tipos de flagelos en el género <i>Vibrio</i> .....	75
Alineamientos de secuencias de las proteínas transmembranales PomA y PomB .....	76
Árboles filogenéticos de las proteínas PomA/ PomB y matrices .....	79
Árbol filogenético de S16 ADNr.....	81
Ensayos de nado en agar blando .....	83
Curvas de crecimiento de las bacterias: <i>Vibrio shilonii</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> . .....	85
Análisis de velocidad de nado en las bacterias: <i>Vibrio shilonii</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i> .....	87

<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>92</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>94</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>96</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
ARNr:	Ácido Ribonucleico ribosomal
ATP:	Trifosfato de Adenosina
ATPasa:	ATP sintasa
<i>B. alcalophilus</i> :	<i>Bacillus alcalophilus</i>
<i>B. harveyi</i> :	<i>Beneckea harveyi</i>
<i>B. subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
CAI-1:	Auto inductor cholerae
<i>C. plumbeus</i> :	<i>Carcharhinus plumbeus</i>
<i>C. crescentus</i> :	<i>Caulobacter crescentus</i>
<i>C. jejuni</i> :	<i>Campylobacter jejuni</i>
CM:	Membrana citoplásmica
C-terminal:	Carboxilo terminal
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i> .
<i>E. novergicus</i> :	<i>E. novergicus</i>
EE. UU.:	Estados Unidos de América
<i>E. scolopes</i> :	<i>Euprymna scolopes</i>
HAI-1:	Autoinductor 1
HAI-2:	Autoinductor 2
<i>H. carunculata</i> :	<i>Hemodice carunculata</i>
HAP's:	Hook-Associated Proteins (Proteínas asociadas al gancho).
HPK:	Cinasa de histidina
<i>L. harveyi</i> :	<i>Lucibacterium harveyi</i>
MB:	Marine Broth (Medio marino)
mM:	Milimolar
µm/seg:	Micrómetros por segundo
nm:	Nanómetros
N-terminal:	Amino-terminal
<i>O. patagónica</i> :	<i>Oculina patagonica</i>
OD:	Densidad óptica
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEM:	<i>Periplasmic region Essential for Motility</i>
rps:	Revoluciones por segundo

RR:	Regulador de respuesta
<i>S. marcescens</i> :	<i>Serratia marcescens</i>
<i>sp</i> :	Especie (Para una especie concreta cuyo epíteto específico es desconocido o carece de importancia)
<i>spp</i> :	Especie (Para referirse a todas las especies individuales dentro de un género).
<i>S. enterica</i> :	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
SH3:	Src-Homology 3
TBSW:	Agua de mar a base de triptona
TCBS:	Sales biliares, tiosulfato-citrato
<i>V. alginolyticus</i> :	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>V. campbellii</i> :	<i>Vibrio campbellii</i>
<i>V. cholerae</i> :	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. coralliilyticus</i> :	<i>Vibrio coralliilyticus</i>
<i>V. fischeri</i> :	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>V. harveyi</i> :	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>V. mediterranei</i> :	<i>Vibrio mediterranei</i>
<i>V. mimicus</i> :	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>V. parahaemolyticus</i> :	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>V. orientalis</i> :	<i>Vibrio orientalis</i>
<i>V. rotiferianus</i> :	<i>Vibrio rotiferianus</i>
<i>V. shilonii</i> :	<i>Vibrio shilonii</i>
<i>V. splendidus</i> :	<i>Vibrio splendidus</i>
<i>V. trachuri</i> :	<i>Vibrio trachuri</i>
<i>V. vulnificus</i> :	<i>Vibrio vulnificus</i>

## RESUMEN

Muchas bacterias son móviles, esta capacidad de movimiento depende de una estructura especial llamada flagelo. Este orgánulo está constituido por aproximadamente 20 proteínas diferentes y está dividido en tres secciones: filamento, gancho y cuerpo basal.

El cuerpo basal funciona anclando al filamento la membrana celular y contiene al motor flagelar además contiene al aparato de exportación y a el eje que transmite la fuerza de rotación a las estructuras extracelulares: gancho y filamento para impulsar a la bacteria.

La energía que necesitan las bacterias para la rotación del flagelo proviene de un gradiente electroquímico de protones  $H^+$  o iones  $Na^+$ . Las bacterias del género *Vibrio* se desplazan mediante el flagelo, principalmente a través de un flujo de iones  $Na^+$  cuyo paso es a través de la membrana interna, y está mediado por las proteínas del motor PomA y PomB.

La motilidad es regulada por la quimiotaxis, la cual es capaz de detectar el medio y dirigir a la población bacteriana hacia un nicho ecológico favorable o alejarse de uno desfavorable.

En organismos patógenos, la motilidad está relacionada con mecanismos de daño al hospedero como en el caso de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y de *V. shilonii*.

Ecológicamente estas especies se encuentran en condiciones semejantes de temperatura y de salinidad. Las bacterias estudiadas en este trabajo habitan en ambientes estuarinos, costeros, en sedimentos, sobre el plancton y en diversos animales.

Las bacterias marinas *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* suelen tener un alto potencial de virulencia, ocasionando pérdida económica de productos marinos a nivel mundial. La bacteria *V. shilonii* es conocida como el patógeno del coral *Oculina patagonica*, produce el blanqueamiento y muerte de este organismo. La bacteria *V. harveyi* es perjudicial en animales marinos, de manera que evita el desarrollo de la larva del camarón y en los peces diversas lesiones, gastroenteritis, necrosis muscular, úlceras en la piel y pudrición de la cola y *V. alginolyticus* es capaz de infectar humanos y animales marinos.

Lamentablemente se conoce poco acerca de la motilidad de bacterias del género *Vibrio*, por lo que el objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la motilidad de bacterias del género *Vibrio* en diversas condiciones salinas en un rango más amplio del que se ha reportado (González *et al.* 2015). En la serie de experimentos descritos en este trabajo nos enfocamos en la descripción y observación del comportamiento de la motilidad del flagelo polar de tres bacterias del

género *Vibrio*, en diversas concentraciones de NaCl, de modo que las bacterias se adaptan a las diversas condiciones de salinidad para poder coexistir y evolucionar. Particularmente el flagelo bacteriano les proporciona una ventaja adaptativa y además participa de manera importante en la interacción bacteria-hospedero en la fauna marina y es considerado como un factor de virulencia o como determinante de simbiosis.

# 1. INTRODUCCIÓN

## Motilidad bacteriana

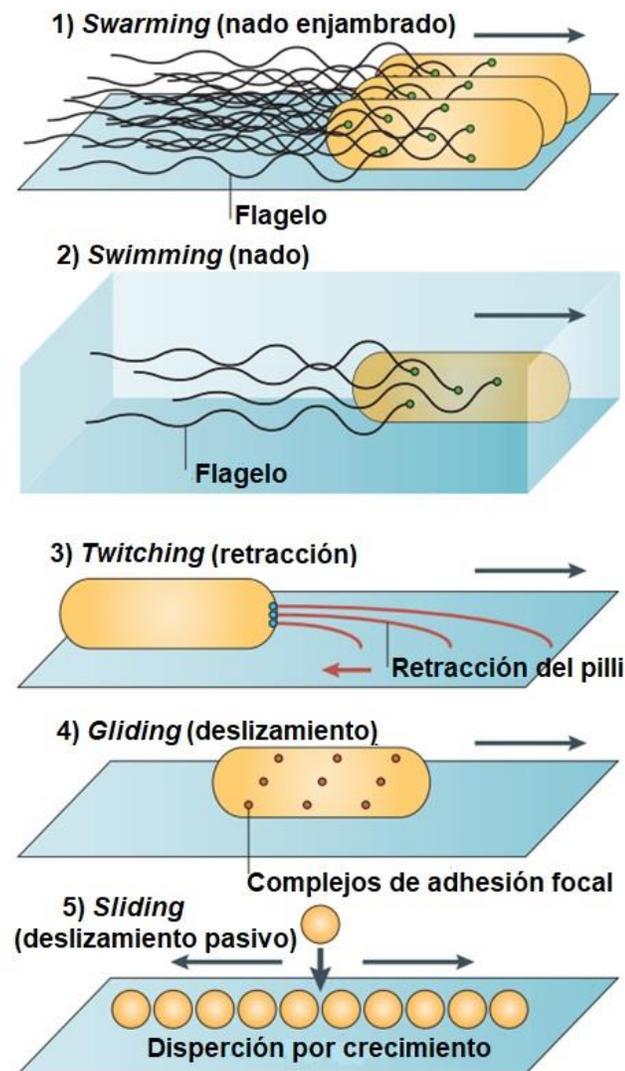
La motilidad es importante para los organismos procariontes, les otorga la capacidad de invadir a su hospedero, desplazarse a un nicho ecológico favorable o alejarse de uno tóxico para esto se sirve de un motor molecular denominado flagelo bacteriano.

El flagelo es un conjunto macromolecular accionado por un gradiente electroquímico de protones ( $H^+$ ) o de iones ( $Na^+$ ). El flagelo del género *Vibrio* es capaz de rotar mediante el flujo de iones  $Na^+$ , mientras que en otras bacterias como: *E. coli* y *S. enterica* utilizan  $H^+$  (Asai *et al.*, 1997). Recientemente se ha encontrado que la especie alcalófila *Bacillus alcalophilus* tiene un motor acoplado con iones potasio ( $K^+$ ) y de rubidio ( $Rb^+$ ), y *Paenibacillus* tiene un motor impulsado por cationes divalentes ( $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) para rotar el motor y lograr su desplazamiento (Onoue *et al.*, 2019).

La motilidad es un fenómeno ampliamente distribuido en la naturaleza y esencial para diversos procesos biológicos (**Figura 1**). Existen varios mecanismos de motilidad en bacterias, por ejemplo:

1. **Swarming (nado en enjambre):** Es un desplazamiento grupal de bacterias impulsadas por el flagelo a través de una superficie. Algunas especies bacterianas más representativas de este movimiento: *Proteus sp.*, *S. enterica* y *E. coli* (Kearns, 2010; Li *et al.*, 2011a).
2. **Swimming (nado):** El desplazamiento de bacterias ocurre de forma individual mediada por el flagelo. Este tipo de movimiento está ampliamente distribuido en ambientes líquidos (Kearns, 2010).
3. **Twitching (retracción):** Este tipo de motilidad se presenta sobre superficies sólidas o semisólidas y los microorganismos son impulsados por la extensión y retracción del pilli tipo IV. La extensión y retracción le confiere un movimiento lento a la célula. (Kearns, 2010; Li *et al.*, 2011a).

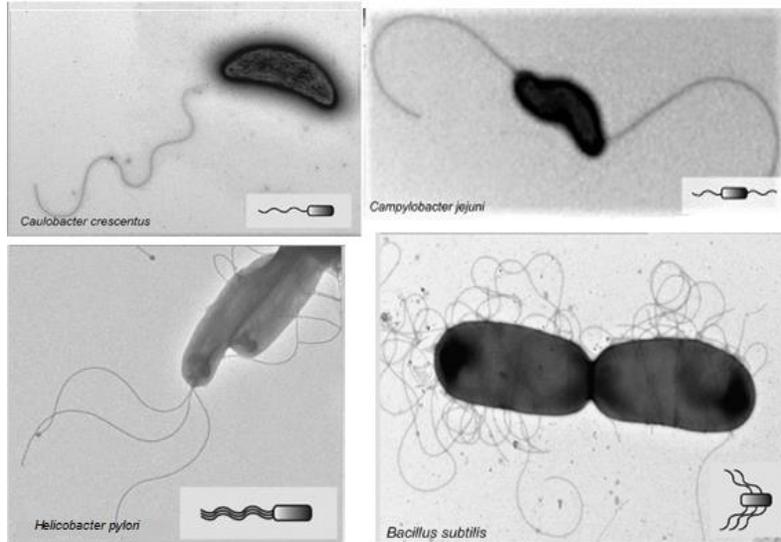
4. **Gliding (deslizamiento):** Es un movimiento que ocurre a lo largo del eje de la célula sin la ayuda de flagelos o del pili. El deslizamiento en general involucra el cuerpo celular moviéndose a través del uso de complejos de adhesión focal que se unen a un sustrato de superficie. Este tipo de movimiento permite alcanzar desplazamientos de hasta 10  $\mu\text{m/s}$  en algunas bacterias y es considerablemente más lento que el mediado por el flagelo (Kearns, 2010; Li *et al.*, 2011a).
  
5. **Sliding (deslizamiento pasivo):** Es un tipo de movimiento impulsado por la presión que ejercen las células durante su crecimiento sobre el sustrato. No requiere de un motor activo pero depende de los surfactantes para reducir la tensión superficial, permitiendo a la colonia separarse del origen y facilitando su dispersión sobre la superficie (Kearns, 2010).



**Figura 1.** Esquema de diferentes formas de motilidad bacteriana. **1) Swarming (nado enjambrado).** Es el desplazamiento grupal sobre superficies sólidas o semisólidas. **2) Swimming (nado).** Es el desplazamiento de bacterias individuales en medio líquido, mediada por flagelos giratorios. **3) Twitching (retracción).** Desplazamiento de bacterias que requiere la extensión y retracción del pili. **4) Gliding (deslizamiento).** Es un desplazamiento que no requiere flagelos o pili e implica complejos de adhesión focal, las cuales están unidos a una estructura helicoidal citoplásmica. **5) Sliding (deslizamiento pasivo).** Este movimiento está impulsado por el crecimiento de las células (Imagen tomada/modificada de Kearns, 2010).

En cuanto al arreglo de los flagelos bacterianos, las bacterias han desarrollado un potencial para adaptarse a nichos ecológicos por lo que se conocen cuatro tipos flagelares (**Figura 2**). Se sugiere que un flagelo es suficiente para nadar en medios líquidos pero se desconoce la razón por la cual algunas bacterias poseen más flagelos. El control del número de flagelos opera a nivel de

expresión de los genes, pero cuándo, cómo y porqué el número de flagelos cambia dentro de una especie es poco entendido (Guttenplan *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Patrones de distribución flagelar en bacterias. **Polar** indica un solo flagelo en uno o ambos polos (*C. crescentus*) **Anfítricos** indica un único flagelo en cada uno de los dos extremos opuestos (*C. jejuni*). **Lofótricos** indica flagelos múltiples en uno o ambos polos (*H. pylori*). **Perítricos** indica flagelos múltiples que surgen a lo largo del cuerpo de la célula (*B. subtilis*). (Imagen tomada/ modificada de Schuhmacher *et al.*, 2015).

## Modelos biológicos y experimentales: *Vibrio shilonii*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*

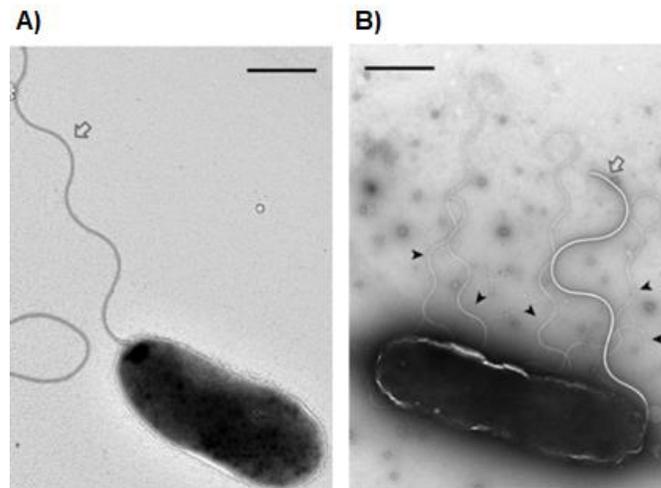
Las bacterias del género *Vibrio* se caracterizan por habitar en ambientes marinos, salobres, estuarinos, en sedimentos, sobre plancton y en animales marinos como el coral, peces, crustáceos y moluscos (Prayitno *et al.*, 1995).

El género *Vibrio* está formado por bacterias Gram-negativas pertenecientes al grupo de las  $\gamma$ -proteobacteria, se clasifican en el orden *Vibrionales*, familia *Vibrionaceae*. No forman esporas, presentan forma de bacilos ( $2.4 \times 1.6 \mu\text{m}$ ) móviles. Algunas bacterias producen dos tipos de flagelos por lo general un único flagelo polar, que se utiliza para el nado en medio líquido (*swimming*), está recubierto por una extensión de la membrana externa y depende de iones  $\text{Na}^+$  para su rotación. (Zhu *et al.*, 2013; Banin *et al.*, 2001a). Los flagelos laterales no están recubiertos por la

membrana externa, estos flagelos se expresan cuando las bacterias nadan en medio sólido o semisólido (*swarming*), se distribuyen en un arreglo peritrico y dependen de  $H^+$  (Atsumi *et al.*, 1992; McCarter *et al.*, 1998). (**Figura 3**).

Estas bacterias se cultivan en medios sólidos o líquidos, forman colonias redondas de color blanco translúcido cuando se cultivan en medio marino (MB) sólido y colonias redondas de color amarillo pálido en el medio de sales biliares, tiosulfato-citrato (TCBS). Son sensibles al agente vibriostático O129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridina), así como a la penicilina, ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomycin y kanamicina.

Otra característica que se ha observado en este género es que algunas bacterias producen luminiscencia como en el caso de *V. harveyi*, *V. orientalis* y *V. fischeri* entre otras. (Banin *et al.*, 2001a).



**Figura 3.** Micrografías electrónicas de *V. shilonii*. En **A**) se observa una célula que expresa un único flagelo polar de un cultivo líquido. En **B**) se observa una célula que expresa flagelos laterales de un cultivo sólido. Las flechas color gris ejemplifica el flagelo polar y las flechas color negro señalan los flagelos laterales. La barra indica 1  $\mu$ m. (Imagen tomada/ modificada de González *et al.*, 2015).

### ***Vibrio shilonii***

La bacteria marina *V. shilonii* es un modelo biológico no muy estudiado en la patogénesis del coral *Oculina patagonica*. La primera observación del blanqueamiento del coral fue registrada en el verano de 1993 en la costa de Israel del Mar Mediterráneo (Kushmaro *et al.*, 1996).

El coral *O. patagonica* posee una relación simbiótica con microalgas fotosintéticas llamadas zooxantelas que proveen hidratos de carbono y lípidos al coral (Walther-Mendoza *et al.*, 2016).

Durante un estudio de bacterias presentes en especies de corales se observó que había un solo tipo de colonia inicialmente conocido como cepa AK-1 asociada al blanqueamiento del coral *O. patagonica* (**Figura 4**), por lo que se realizó una observación con microscopia electrónica de barrido de los corales blanqueados y mostró que estas bacterias se concentraron en la interfaz entre los tejidos sanos y blanqueados. Para probar si la cepa AK-1 era el agente causante de la enfermedad del blanqueamiento, se aplicaron los postulados de Koch:

**i)** La cepa AK-1 se aisló de 28 muestras tomadas de corales blanqueados y estuvo ausente en las 24 muestras tomadas de corales que no presentaban blanqueamiento.

**ii)** La cepa AK-1 se obtuvo en cultivo puro, y fue clasificada como una nueva especie de *Vibrio* y se le dio el nombre de *V. shiloi* en honor al pionero de la ecología microbiana en Israel.

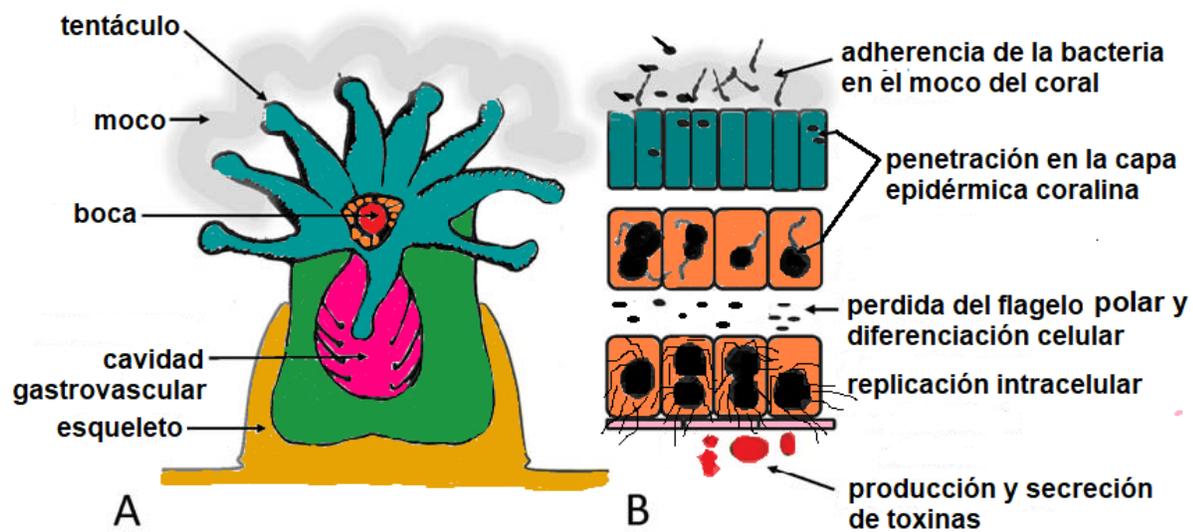
**iii)** En experimentos con acuarios controlados, *V. shiloi* causó el blanqueo de corales sanos.

**iv)** La bacteria *V. shiloi* se volvió a aislar de los tejidos de los corales blanqueados e infectados. Dado que, todos los postulados fueron comprobados, se concluyó que *V. shiloi* es el agente causante del blanqueamiento de *O. patagonica* en el mar Mediterráneo (Rosenberg, and Falkovitz., 2004). Finalmente, la especie se designó como *V. shilonii* (Kushmaro *et al.*, 2001).



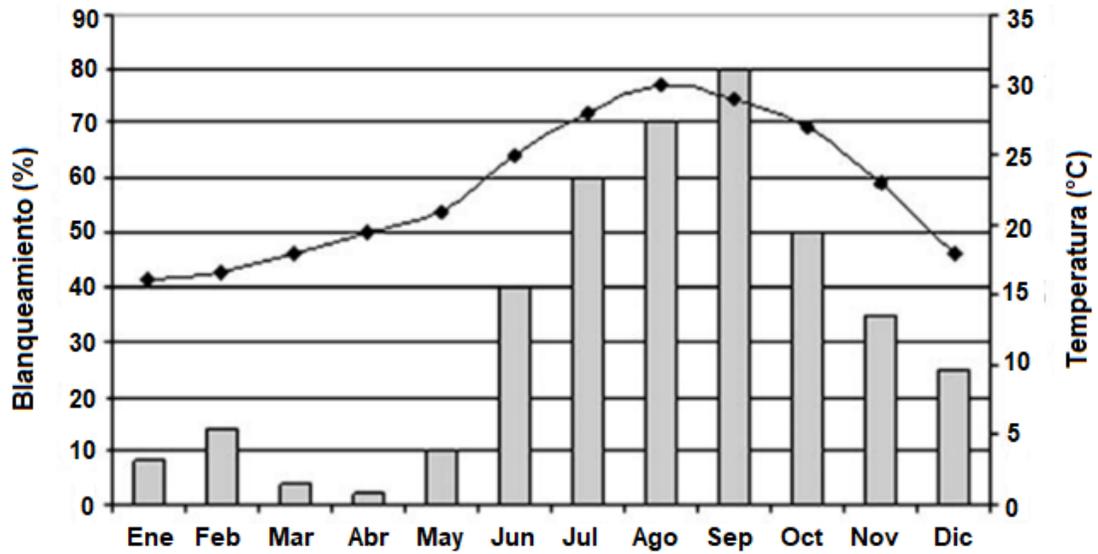
**Figura 4.** Blanqueamiento en los corales de la especie *O. patagonica* causado por *V. shilonii*. El color verde corresponde al alga zooxanthellae que aún se encuentran dentro del tejido mientras que la parte blanca señala la infección causada por *V. shilonii* que ha terminado de lisar las células de las algas ocasionando el blanqueamiento del coral (Imagen tomada de Rosenberg and Falkovitz., 2004).

El proceso de infección de virulencia en *V. shilonii* es explicado generalmente por cinco pasos: **i)** Adherencia de la bacteria a un receptor por un  $\beta$ -galactósido en el moco del coral. **ii)** Penetración en la capa epidérmica coralina. **iii)** Pérdida del flagelo polar y su diferenciación en forma de coco hacia un estado viable no cultivable (Viable Non Cultivable). **iv)** Se réplica de manera intracelular hasta alcanzar un número aproximado de  $10^8$  bacterias por  $\text{cm}^3$  de tejido coralino. Y **v)** Producción y secreción de un péptido de doce residuos, rico en prolina, denominado toxina P que es capaz de inhibir la fotosíntesis y lisar las zooxantelas induciendo la muerte del coral (Banin *et al.*, 2001b) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Esquema del coral. En **A)** Se observa las estructuras que constituyen al coral. En **B)** Se observa los pasos del mecanismo de virulencia en el tejido coralino. (Imagen tomada y modificada de la referencia Munn, 2015).

Este mecanismo de virulencia ha sido identificado durante el verano. El incremento de las temperaturas del agua de mar oscila entre  $20^{\circ}\text{C}$ - $32^{\circ}\text{C}$ , produce un aumento en el blanqueamiento de los corales, concluyéndose que *V. shilonii* es potencialmente virulenta durante el verano, de manera que estas temperaturas originan la activación de los genes necesarios para una infección exitosa (Rosenberg and Falkovitz, 2004). Por otro lado, en invierno las temperaturas se encuentran alrededor de  $15^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$ , y no se han observado porcentajes altos de blanqueamiento en los corales (**Figura 6**). En esta época del año *V. shilonii* se aísla en su reservorio *Hemodice carunculata* conocido como el “gusano de fuego”. (**Figura 7**) (Banin *et al.*, 2001a).



**Figura 6.** Patrón anual de blanqueamiento del coral *Oculina patagónica* frente a la costa de Israel, de 1995 a 2003. (♦) Valores del promedio mensual de la temperatura, (barras) porcentaje de decoloración (Imagen tomada de Rosenberg and Falkovitz., 2004).



**Figura 7.** Se muestra el reservorio y vector del patógeno *V. shilonii*: *H. carunculata* también conocido como “gusano de fuego”. Este reservorio solo se presenta en las estaciones de invierno (Imagen tomada de Rosenberg and Falkovitz., 2004).

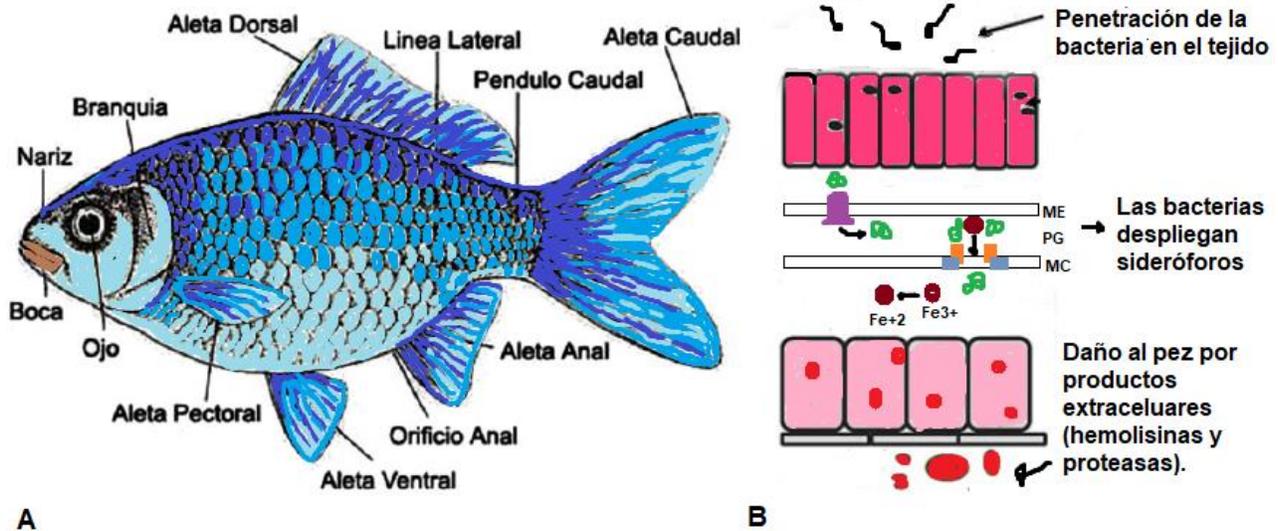
## *Vibrio harveyi*

La bacteria *V. harveyi* originalmente fue nombrada como *Achromobacter harveyi* en honor al pionero en el estudio de la sistemática de bioluminiscencia E. N. Harveyi, así mismo se le ha denominado *Lucibacterium harveyi* y *Beneckea harveyi* y en su posición taxonómica actual *V. harveyi*. La historia de *V. harveyi* inicia en el desarrollo de la acuicultura ya que este microorganismo es reconocido como el causante de una grave enfermedad en vertebrados e invertebrados marinos como: corales, bivalvos, peces, ostras, caballitos de mar y en particular crustáceos de la familia *Penaeidae* como: el camarón y langostinos los cuáles son afectados en el desarrollo larvario ocasionando pérdidas económicas a nivel mundial. El modelo mejor estudiado en vertebrados marinos ha sido en peces. Los peces infectados por *V. harveyi* pueden presentar una variedad de lesiones, que incluyen lesiones oculares/ceguera, gastroenteritis, necrosis muscular, úlceras en la piel y pudrición de la cola. (Zhang *et al.*, 2020).

El crecimiento óptimo de *V. harveyi* se ha observado entre 30°C-35° C y no crece por debajo de 4°C.

En la clasificación actual de *V. harveyi* primero existió un antecedente que menciona que en el acuario Nacional de Baltimore, EE. UU; murió un tiburón arenoso *Carcharhinus plumbeus*, en este organismo marino se encontró un microorganismo el cual fue aislado y clasificado como *V. carchariae*. Estudios taxonómicos concluyeron que este procarionte es un agente virulento para vertebrados marinos (Austin *et al.*, 2006). Finalmente, Thompson *et al.* 2002, realizaron un análisis filogenético designando a *V. carchariae* como *V. trachuri* y más tarde por otras observaciones se estableció como *V. harveyi* (Owens *et al.*, 2006).

El modo de infección en el pez por *V. harveyi* consiste en tres pasos básicos: **i)** La bacteria penetra los tejidos del huésped por medio de motilidad quimiotáctica; **ii)** Dentro de los tejidos del huésped la bacteria despliega sistemas que secuestran hierro, por ejemplo, sideróforos, para "robar" el hierro del hospedero; **iii)** La bacteria eventualmente daña al camarón por medio de productos extracelulares, como hemolisinas y proteasas (Thompson *et al.*, 2004) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema del pez. En **A)** Se observa las estructuras que constituyen al pez. Imagen tomada/editada de Dueñas-Ramírez *et al.*, 2012. En **B)** Se observa el mecanismo de virulencia. (Imagen tomada/modificada de Munn, 2015).

La virulencia de *V. harveyi* puede ser controlada por la interrupción del “quórum sensing” que es un proceso que permite la comunicación celular entre las células por medio de moléculas de señalización conocidas como autoinductores que regulan la formación de biopelículas, éstas se producen cuando la bacteria infecta a su hospedero y crece adherida sobre el tejido formando comunidades bacterianas. Los autoinductores también regulan la secreción tipo III, que es la maquinaria que necesita el patógeno para transportar sus toxinas, la producción de sideróforos (compuestos quelantes de hierro) y la activación de genes que contribuyen a la virulencia en diferentes huéspedes (Nackerdien *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014). Este mecanismo se descubrió por primera vez en la bacteria *V. fischeri* aislada del calamar *E. scolopes* y se pensó que estaba restringido a solo un número limitado de especies, más tarde, se encontraron sistemas similares en muchas otras especies del género *Vibrio*. (Defoirdt *et al.*, 2008). La relación entre la bacteria y el calamar no es patogénica, sino mutualista.

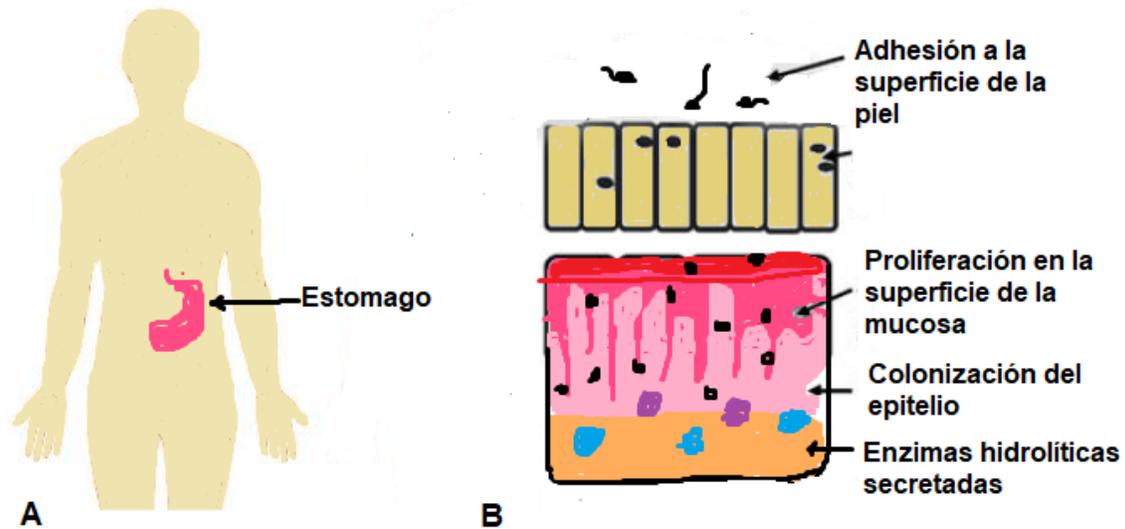
## *Vibrio alginolyticus*

Alrededor del año 1950 la bacteria *V. parahaemolyticus* era considerada como la causante principal de enfermedades gastrointestinales, ya que ocasionó un brote de intoxicación en los suburbios del sur de Osaka, Japón. Existe evidencia donde se ha reportado la intoxicación de 272 personas al consumir la sardina *Engraulis japonica* y 20 de éstas murieron. Por otra parte, Fujino y su equipo de investigación realizaron experimentos, en los que aislaron los microorganismos del tracto intestinal de las personas infectadas y observaron dos tipos de bacterias Gram-negativas. En 1965 Zen-Yoji *et al* sugirió que *V. parahaemolyticus* está dividido dentro de dos biotipos. Y en 1968 Sakazaki *et al* designó al biotipo II de *V. parahaemolyticus* como *V. alginolyticus* (Joseph and Colwell, 1982).

Una clara diferencia entre las dos especies es que *V. alginolyticus* tiene la capacidad de producir acetoina y fermentar sacarosa, mientras que en *V. parahaemolyticus* esta característica no se ha observado (Sabir *et al.*, 2013).

La bacteria *V. alginolyticus* es considerada la especie más halófila de todas las especies del género *Vibrio*. Generalmente se distribuye mundialmente en países con aguas costeras templadas y tropicales, especialmente cuando la temperatura del agua es superior a los 17°C (Reilly *et al.*, 2011). Este patógeno es en gran medida, oportunista, ya que causa infecciones sistémicas en personas inmunodeprimidas con enfermedades subyacentes tales como: enteritis, cáncer, conjuntivitis, septicemia primaria, entre otras. La mayoría de estas infecciones se adquiere por exposición de heridas en el medio marino (Gómez *et al.*, 2003) o por el consumo de diversidad de peces, moluscos y crustáceos infectados por *V. alginolyticus*. Esta bacteria posee baja virulencia, por lo que algunas infecciones pueden ser tratadas con antibióticos. La bacteria *V. alginolyticus* es resistente a tetraciclina y cloranfenicol (Ravikumar and Vijayakumar, 2017).

Los pasos para la patogénesis de virulencia de *V. alginolyticus* en sus hospederos especialmente en humanos se describe en cuatro pasos **i)** La adhesión a la superficie de la piel, **ii)** Proliferación en la superficie de la mucosa como resultado de actividades hidrolíticas, **iii)** Capacidad de utilizar el moco como única fuente de nutrientes y **iv)** Colonización del epitelio subyacente induciendo a enzimas hidrolíticas secretadas por *V. alginolyticus* tales como proteasas, hemaglutinina, enterotoxina, citotoxina y otros factores de virulencia no caracterizados (Balebona *et al.*, 1998; Croci *et al.*, 2001) (**Figura 9**)

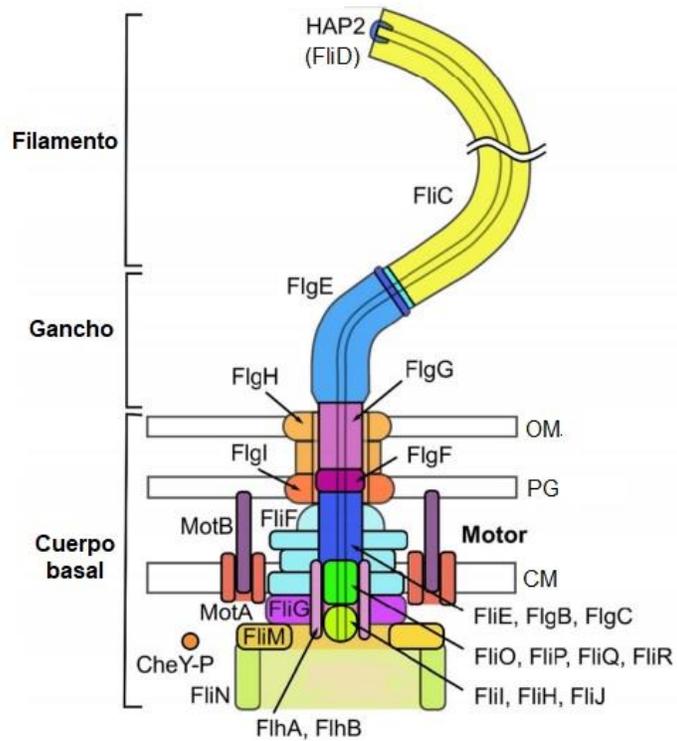


**Figura 9.** Esquema del humano. En **A)** Se observa el órgano afectado al ingerir productos marinos infectados por *V. alginolyticus*. En **B)** Se observa el mecanismo de virulencia. (Imagen tomada/modificada de Munn, 2015).

## Estructura del flagelo

El flagelo bacteriano es un complejo supramolecular constituido por aproximadamente 20 proteínas diferentes. Esta estructura es altamente compleja y eficiente ya que no solo impulsa a la célula, sino que también es importante para la formación de biopelículas y adhesión a superficies, contribuyendo de esta manera al proceso de virulencia en especies patógenas. El flagelo del género *Vibrio* rota a aproximadamente 1.700 rps (Morimoto and Minamino., 2014).

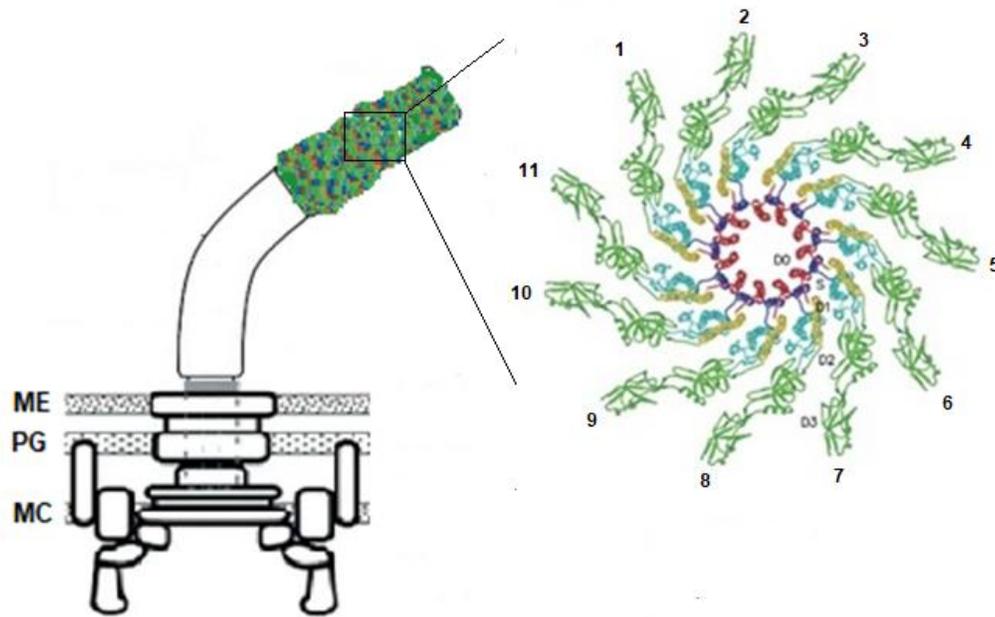
El flagelo es la estructura principal de la motilidad en bacterias y está conformado por tres componentes: **el filamento** que realiza un trabajo mecánico y contribuye al desplazamiento del cuerpo celular; **el gancho** que transmite el torque producido por el motor al filamento y **el cuerpo basal** compuesto por el aparato de exportación, por varios anillos embebidos en la membrana celular (Morimoto and Minamino, 2014) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Esquema del flagelo bacteriano. Se observan los componentes proteínicos del cuerpo basal, el eje, el gancho y el filamento. (Imagen tomada/modificada de Kitao and Hata, 2018).

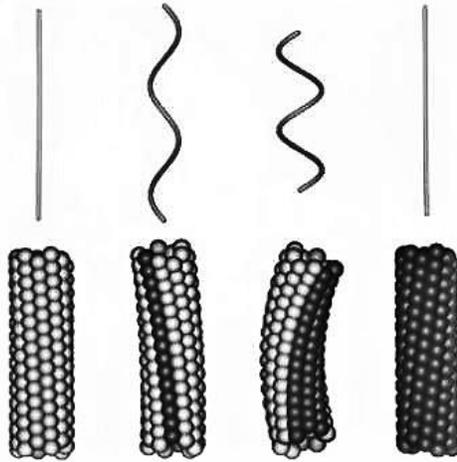
## El filamento

El filamento es el componente más abundante del flagelo y puede llegar a medir 15  $\mu\text{m}$  de longitud y 20 nm de diámetro. Esta estructura posee una forma tubular, helicoidal y es extracelular. Está constituido por 11 protofilamentos de una proteína llamada flagelina (FliC) (**Figura 11**).



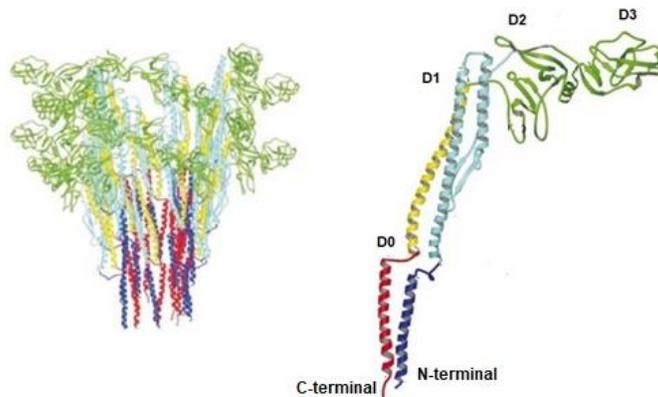
**Figura 11.** Esquema del filamento flagelar. Vista desde extremo distal del filamento mostrando 11 protofilamentos de FliC. (Imagen tomada/modificada de la referencia Fujii and Namba, 2009).

Estas subunidades de FliC se asocian a la estructura helicoidal con 5.5 subunidades por vuelta. Las formas helicoidales conocidas también como polimorfismos, son producidas por un super enrollamiento causado por la mezcla de dos conformaciones distintas, la tipo hélice L (izquierda) y la tipo hélice R (derecha) (Yonekura *et al.*, 2003). Las dos conformaciones son ligeramente distintas. Las medidas de difracción de rayos X, muestran que las distancias entre las unidades de cada protofilamento es de 52.7 Å y 51.9 Å para las conformaciones L y R respectivamente. Cuando los 11 protofilamentos se encuentran en la misma conformación se produce un filamento macromolecular recto (Samatey *et al.*, 2001; Terashima *et al.*, 2008). En los filamentos rectos de tipo L todos los protofilamentos están dispuestos hacia la izquierda y mientras que los de tipo R se inclinan hacia la derecha, y cuando existen mezclas de ambos tipos de protofilamentos se producen hélices macromoleculares **Figura 12.**



**Figura 12.** Esquema del protofilamento tipo L y R. En los extremos se observa los filamentos formados por un solo tipo de protofilamentos L y R respectivamente y en el centro los filamentos que poseen ambos protofilamentos (Imagen tomada de Terashima *et al.*, 2008)

La estructura cristalográfica de la flagelina se compone de cuatro dominios **D0**, **D1**, **D2** y **D3**. Los dominios **D0** y **D1** forman el núcleo denso del filamento con una doble estructura tubular concéntrica en el centro, este tiene un diámetro de aproximadamente 23 nm con un canal central de aproximadamente 2 nm (Erhardt *et al.*, 2010). Los dominios **D2** y **D3** se extienden hacia el exterior. La interacción de las subunidades de flagelina ocurre de forma axial y de forma lateral por los dominios **D0** y **D1**, así mismo se ha observado por microscopía electrónica que el dominio del núcleo interno **D0** forma una  $\alpha$ -hélice helicoidal (Maki-Yonekura *et al.*, 2010) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Diagrama de listones de la estructura terciaria de la flagelina (FliC) Vista lateral desde el exterior del filamento, se muestra los dominios **D0** formado por el carboxilo terminal (rojo) y el N-terminal (azul), **D1** del N-terminal (cian) y C-terminal (amarillo), **D2** y **D3** (verde). (Imagen tomada/modificada de Yonekura *et al.*, 2003).

Durante la elongación del filamento, las subunidades de flagelina (FliC), necesitan la participación de una proteína asociada al gancho HAP2 (FliD) que tiene una estequiometría de 6-12 copias y esta proteína tiene la función de evitar que las subunidades de flagelina se disocien en el espacio extracelular al ser exportadas y facilita la elongación del filamento. También se propone que FliD ó HAP2 está asociada en un homopentámero y actúa como una chaperona que le permite a la flagelina polimerizar. El pentámero de FliD interactúa con el dominio **D0** de la proteína FliC formando un complejo FliC-FliD, dicha interacción permite la existencia de un orificio al final del filamento, este sitio permite que el plegamiento de una subunidad de flagelina sea insertada en la punta del filamento creciente permitiéndolo su elongación (Yonekura *et al.*, 2003).

## El gancho

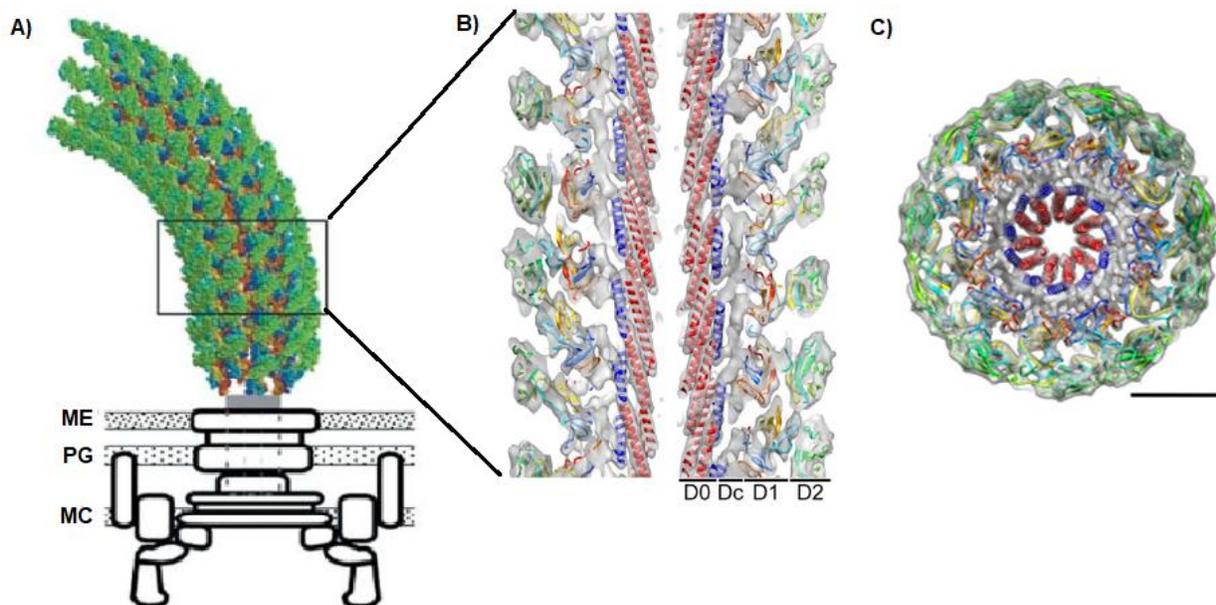
El gancho es una estructura flexible, tubular, helicoidal con un diámetro de 18 nm y una longitud aproximada de 55 nm la cual es determinada por la proteína FliK. Se conforma de aproximadamente 120 copias de monómeros de la proteína FlgE. (Saijo-Hamano *et al.*, 2019). Esta estructura posee una forma curva en algunas bacterias como las entéricas y sirve de unión entre el filamento y el cuerpo basal. (**Figura 14**). La arquitectura del gancho se describe como una fibra tubular organizada en 11 protofilamentos y poseen una simetría de 5.5 subunidades por vuelta el cual se ensambla mediante la proteína de andamiaje FlgD que es esencial para la polimerización de FlgE (Erhardt *et al.*, 2011).

Además de la proteína HAP2, existen otras proteínas asociadas al gancho, conocidas como **HAP's (Hook-Associated Proteins)** HAP1 y HAP3 (FlgK y FlgL) con una estequiometría de 10-15, y 10-30 copias respectivamente. El gancho se une al filamento mediante las proteínas adaptadoras HAP1 (FlgK) y HAP3 (FlgL) que sirven como proteínas adaptadoras entre el filamento y el gancho. (Ikeda *et al.*, 1987).

El gancho de *S. enterica* ha sido estudiado por cristalografía de rayos-X y criomicroscopía electrónica. La proteína FlgE está conformada por tres dominios: **D0**, **D1** y **D2** y una región que conecta a los dominios **D0** y **D1** denominada **Dc**. Los tres dominios están dispuestos radialmente desde el interior a la parte exterior de la estructura tubular del gancho. Para la región **Dc** aún no se

ha construido un modelo atómico debido a la baja resolución de densidad del mapa actual (Fujii *et al.*, 2009). Recientemente se ha estudiado el gancho de *Campylobacter jejuni* el cual sugiere que los dominios **D0** y **D1** están unidos por una estructura extendida en forma de L denominada estiramiento en L que interactúa con los tres dominios **D0**, **D1** y **D2**, estabilizando al gancho. Se sugiere que el gancho de *S. enterica* y *C. jejuni* son similares por lo que se esperaría que la región **Dc** de *S. enterica* adopte una estructura similar de la estructura estiramiento en L de *C. jejuni* (Matsunami *et al.*, 2016; Saijo-Hamano *et al.*, 2019).

El dominio **D0** se encuentra al centro de la estructura tubular y está conformado por dos estructuras  $\alpha$ -hélice. El dominio **D1** y el dominio **D2** están compuestos por estructuras  $\beta$  y están conectados por dos pequeñas cadenas  $\beta$  antiparalelas, estos dominios se encuentran empaquetados a lo largo del protofilamento, la distancia entre subunidades puede compactarse o extenderse hasta aproximadamente 9 Å. Se ha encontrado que esta propiedad le permite a la estructura adquirir una forma curva (Samatey *et al.*, 2004).



**Figura 14.** Modelo del gancho flagelar. **A)** Esquema del gancho flagelar. Imagen tomada y modificada de Erhardt *et al.*, 2010. **B)** Esquema desde el extremo distal del gancho, el diámetro es de 180 Å y el canal interno es 18 Å **C)** Dominios **D0**, **Dc**, **D1** y **D2** de la proteína FlgE. La barra en negro indica 50 Å (Imagen tomada/modificada de Fujii *et al.*, 2009).

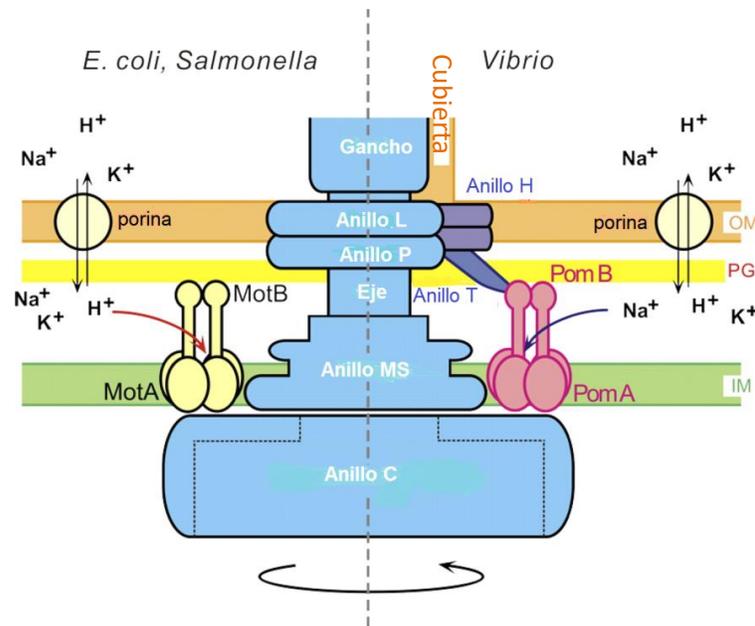
## El cuerpo basal

El cuerpo basal está conformado por: el anillo C, el anillo MS, el anillo P, el anillo L, el eje, el motor y el aparato de exportación (**Figura 15**).

El anillo MS es la base del motor flagelar está inmerso en la membrana citoplasmática y se conforma de 26 copias de la proteína FliF. Este anillo sirve de base para el ensamble de las proteínas del eje (Ueno *et al.*, 1992).

El anillo P se ubica en el periplasma asociado a la pared de peptidoglicano y está formado por 26 copias de la proteína.

El anillo L está formado por 26 copias de la proteína FlgH y está en la membrana externa FlgI (González *et al.*, 2015)



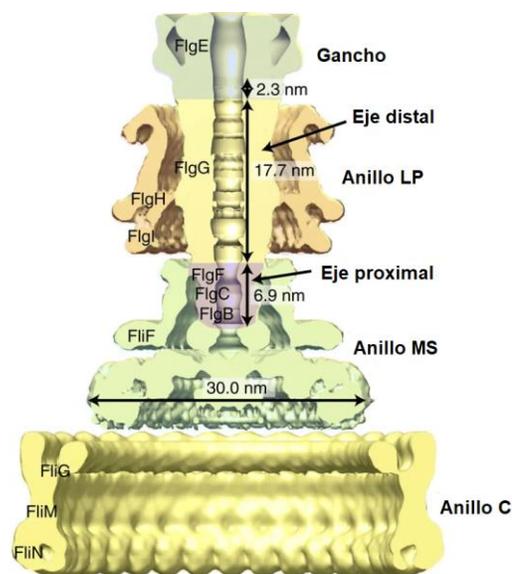
**Figura 15.** Componentes del cuerpo basal. Esquema representativo de los principales componentes, se observa tanto el eje como las estructuras anulares: el anillo C, el anillo MS, el eje, el anillo P y el anillo L (Imagen tomada/modificada de Yonekura *et al.*, 2011).

## El anillo C

Se localiza en la base del flagelo, hacia la cara citoplasmática de la membrana interna cuya estructura está formada por tres proteínas FliG, FliM y FliN, también conocido como el “switch” flagelar y está involucrado en el cambio de dirección de la rotación del flagelo bacteriano (Jarrel *et al.*, 2008).

## El eje

Es una estructura tubular, rígida y tiene una longitud de aproximadamente 30 nm, funciona como un transmisor del torque generado por la rotación del motor flagelar y se divide en dos secciones: proximal y distal. La sección proximal mide 6.9 nm de longitud y se compone por tres proteínas distintas: FlgB, FlgC, FlgF y la sección distal con un longitud de 17.7 nm que se compone por la proteína FlgG. En conjunto poseen una estequiometria de 6, 6, 6 y 26 subunidades respectivamente (Fujii *et al.*, 2017) (**Figura 16**).



**Figura 16.** Esquema del eje flagelar en *Salmonella*. Se observa en color violeta el eje proximal compuesto por las tres proteínas FlgB, FlgC y FlgF y en color beige el eje distal conformado por la proteína FlgG (Imagen tomada/modificada de Fijii *et al.*, 2017).

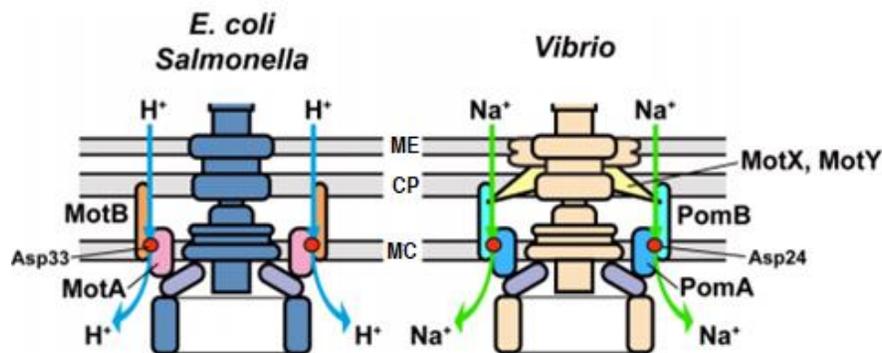
## El motor

El motor bacteriano es una estructura que opera por un mecanismo rotatorio. En algunas bacterias, es capaz de rotar en dos sentidos: a favor de las manecillas del reloj (CW) y en contra de las manecillas del reloj (CCW). En aquellas bacterias que poseen más de un flagelo como *S. enterica* y *E. coli* cuando giran en dirección CCW, los filamentos se entrelazan formando una trenza que impulsa a la célula. Cuando giran en dirección CW se deshace la trenza y el filamento deja de impulsar, de manera que la célula presenta un cambio en la dirección del nado ocasionando que ésta se reoriente (Minamino *et al.*, 2015). El motor se localiza en la base del flagelo y se puede subdividir en dos componentes principales: el rotor y el estator.

Algunas bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *S. enterica*, son impulsadas por  $H^+$  a través de dos proteínas que conforman el estator MotA y MotB, en bacterias del género *Vibrio* se les conoce como PomA y PomB. Estas proteínas son esenciales para la generación del torque en el motor. En el caso de los microorganismos alcalófilos o marinos como el género *Vibrio* y una bacteria en particular *B. subtilis* los motores son impulsados por un flujo de iones  $Na^+$  (Kojima *et al.*, 1999) (**Figura 17**).

El motor de las bacterias del género *Vibrio* contiene estructuras anulares específicas, el anillo T y el anillo H. El anillo T es esencial para el anclaje del estator al motor, y el anillo H funciona como punto de apoyo para la fijación del anillo T en el motor (Takakewa *et al.*, 2016).

El torque es generado por la interacción del complejo de “switch” (anillo C) y por los estatores asociados a la membrana celular (Thormann *et al.*, 2010)

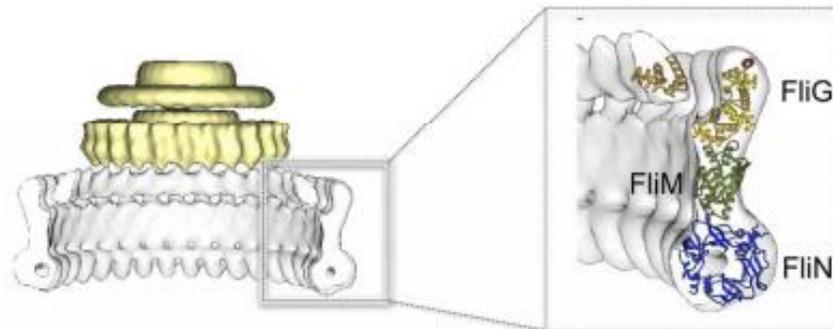


**Figura. 17** Esquema representativo de dos tipos de motores en bacterias gram-negativas. El panel de la izquierda corresponde a un motor impulsado por iones  $H^+$ , funcional en *E. coli* y *S. enterica*, mientras que el panel de la derecha

representa el motor de bacterias marinas de la familia *Vibrionaceae* impulsadas por iones  $\text{Na}^+$ . **ME**, membrana externa; **CP**, capa de peptidoglicano; **MC**, membrana citoplasmática (Imagen tomada/modificada de Morimoto and Minamino, 2014).

## El rotor

El rotor consta de tres proteínas flagelares: FliG, FliM y FliN que se ensamblan formando el anillo C en la cara citoplásmica del anillo MS (**Figura 18**). FliG se asocia directamente con la cara citoplasmática del anillo MS con una estequiometría 1:1 (FliG:FliF). La proteína FliG consta de tres dominios, FliG<sub>N</sub>, FliG<sub>M</sub> y FliG<sub>C</sub>. El dominio FliG<sub>N</sub> es el responsable de la unión al anillo MS y por lo tanto forma el borde exterior de este anillo. El dominio FliG<sub>C</sub> está involucrado en la interacción con una proteína del estator MotA. Por otro lado FliG<sub>M</sub> interacciona con la proteína FliM. Las proteínas FliM y FliN forman un complejo estable con una estequiometría 1:4 (FliM:FliN) y ocupan la mayor parte del anillo C. Como ya se mencionó anteriormente las proteínas FliG, FliM y FliN forman el complejo “switch” el cual es responsable del cambio en la rotación del motor entre las direcciones CW y CCW (Morimoto and Minamino 2014).



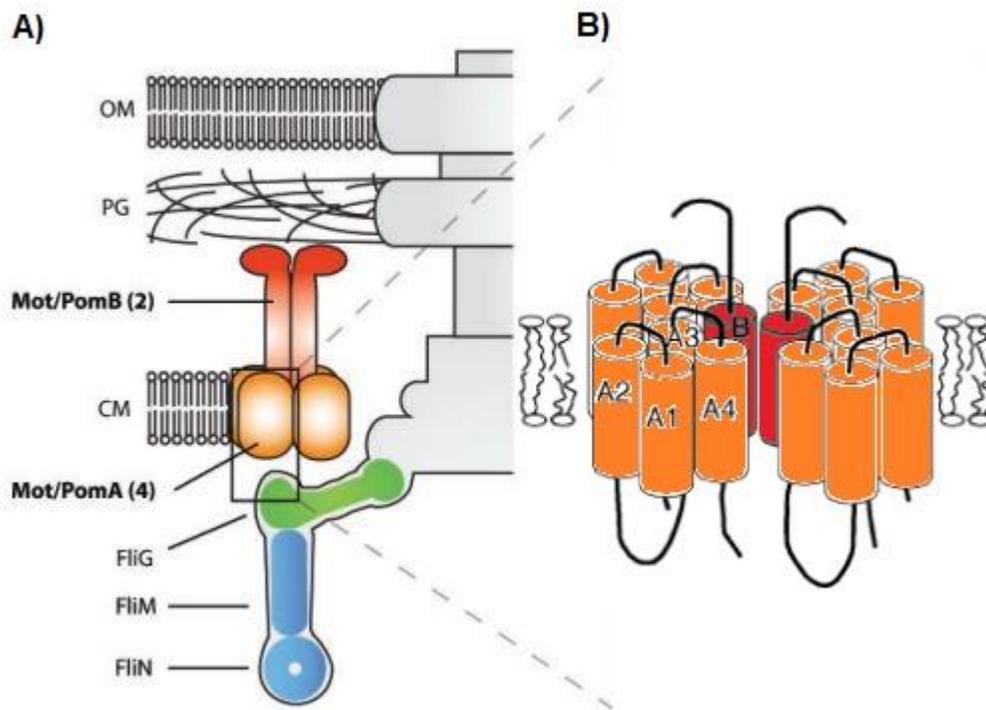
**Figura 18.** Esquema representativo del rotor. Se observa los anillos C y MS formado por las proteínas FliG, FliM, FliN (Imagen tomada de Zhao *et al.*, 2014).

## El estátor

El estátor bacteriano es un conjunto de elementos que impulsan la rotación del motor flagelar usando energía de la fuerza motriz de iones. En algunos microorganismos, como *E. coli*, el flujo de  $\text{H}^+$  energiza la rotación del motor, mientras que en la bacteria marina *V. alginolyticus*, se ha

identificado que el potencial electroquímico es suministrado por el flujo de iones  $\text{Na}^+$ . No obstante existen casos como el de la bacteria *B. alcalophilus* que posee un motor que utiliza  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  como iones de acoplamiento para la rotación flagelar (Terahara *et al.*, 2012). Se sugiere que la interacción entre el rotor y el estátor convierte el gradiente electroquímico en energía mecánica para producir la rotación del flagelo. El mecanismo molecular exacto detrás de este proceso sigue siendo desconocido (Kumar *et al.*, 2017).

El estátor está conformado por las proteínas MotA y MotB (dependientes de  $\text{H}^+$ ) las cuales en bacterias alcalófilas son homólogas a las proteínas PomA y PomB (dependientes de  $\text{Na}^+$ ). Estas proteínas forman un complejo de 4 subunidades MotA y 2 subunidades MotB (**Figura 19-A**). Estos complejos atraviesan la membrana citoplasmática para formar un canal de iones cuya función es proporcionar la energía para la generación del torque (Stock *et al.*, 2012).



**Figura 19.** Esquema de interacción entre el rotor y estátor **A)** Se muestra a los estátors interactuando con el complejo interruptor, que está compuesto por las proteínas FliG, FliM y FliN. Cada complejo de estátor consta de cuatro subunidades MotA y dos subunidades MotB (Imagen tomada/modificada de Thorman and Paulick 2010). **B)** Se muestra una subunidad de MotA conformado por cuatro dominios transmembranal que interactúan con FliG (Imagen tomada/modificada de Braun *et al.*, 2004).

El número de estatores presentes en el flagelo depende de la especie bacteriana. *E. coli* posee entre 11 ó 12 estatores y estos participan sincronizadamente en la rotación flagelar. Se postula que dos subunidades de MotA y una subunidad de MotB forman un canal de iones de tal manera que cada complejo del estator está formado por dos canales. Las subunidades MotA/PomA tienen cuatro dominios transmembranales; se sugiere que los dominios transmembranales 2 y 3 interactúan con FliG en el complejo del interruptor (**Figura 19-B**) (Thormann and Paulick, 2010). MotB/PomB tiene una sola hélice transmembranal en el N-terminal, en esta hélice se encuentra un residuo conservado cargado negativamente (Asp32/Asp24) que es el sitio de unión del ión ( $H^+/Na^+$ ). MotB/PomB se encuentra en el espacio periplásmico y en su extremo C-terminal posee un dominio de unión al peptidoglicano, que permite su anclaje a la pared celular. En el complejo MotA<sub>4</sub>MotB<sub>2</sub>, el dímero de MotB se encuentra en el centro del complejo y las hélices transmembranales de MotA se sitúan alrededor (Braun *et al.*, 2004).

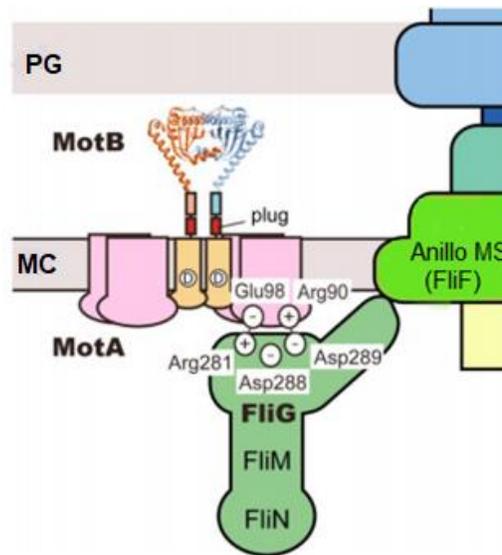
El proceso de rotación ha sido ampliamente estudiado, sin embargo no se conocen los mecanismos precisos de generación del torque, pero se conocen algunos modelos que proponen el mecanismo por el cual se genera el torque (Reid *et al.*, 2006). El modelo más aceptado sugiere que la interacción electrostática entre el motor y el estator permite la generación del movimiento flagelar (Takekawa *et al.*, 2014).

## **Generación del torque: interacción entre el estator y el motor**

Se sugiere que la translocación de  $H^+$  para las bacterias *E. coli* y *S. enterica* en el complejo MotA/MotB induce cambios conformacionales en el asa citoplásmica de MotA permitiendo que los residuos cargados en esta asa interactúen con la proteína FliG (Yorimitsu, 2004; Morimoto *et al.*, 2010).

En las bacterias del género *Vibrio* como: *V. cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, el paso de los iones, a través de la membrana interna, es conducido por el canal que forman las proteínas del estator PomA y PomB. El principio para el funcionamiento del motor impulsado por  $Na^+$ , es el mismo que en el motor impulsado por  $H^+$ . Los iones  $Na^+$  se unen a un residuo conservado de aspartato (Asp24) en PomB, para ser translocados al citoplasma. El paso de los iones  $Na^+$  induce un cambio conformacional en PomA que modifica su interacción con la

proteína FliG. La interacción de los residuos cargados Lis284, Arg301, Asp308, Asp309 y Arg317, ubicados dentro del dominio carboxilo terminal de FliG, con los residuos Arg88 y Glu96 (residuos cargados equivalentes a los de MotA) y otros residuos adicionales: Lis89, Glu97 y Glu99 en el asa citoplásmica de PomA, generan la rotación del flagelo polar (Therashima *et al.*, 2008; González *et al.*, 2015) (**Figura 20**).

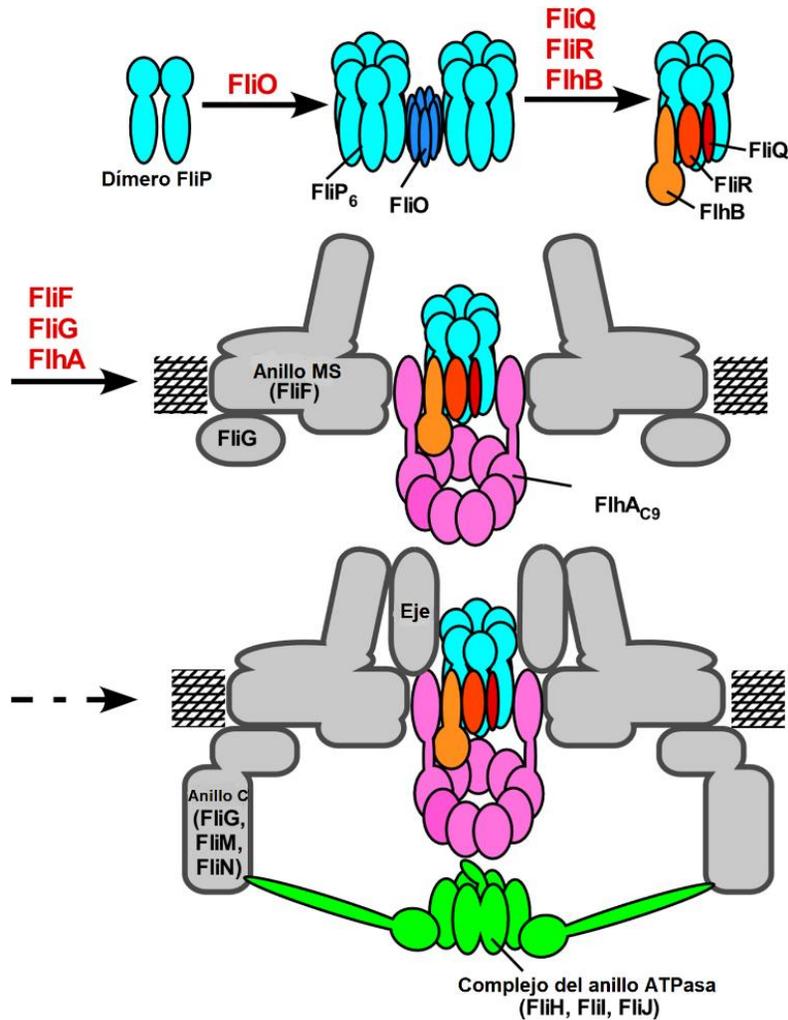


**Figura 20.** Esquema de las interacciones de la interface rotor- estator. Se propone que FliG ocupa la parte superior del anillo C. Las interacciones entre MotA-Arg90 y FliG-Asp289 y entre MotA-Glu98 y FliG-Arg 281 están directamente involucradas no solo en la generación del torque sino también en el ensamblaje del estator alrededor del rotor (Imagen tomada/modificada de Morimoto and Minamino, 2014).

### Aparato de exportación flagelar tipo III

El aparato de exportación se encuentra en el poro central del anillo MS (FliF), está compuesto por seis proteínas integrales de la membrana FliO, FliP, FliQ, FlhA, FlhB y FliR, y tres proteínas citoplasmáticas FliI, FliH y FliJ (complejo ATPasa) (**Figura 21**). Existen también tres proteínas que actúan como chaperonas específicas las cuales facilitan la exportación de algunos sustratos: FlgN para FlgK (HAP-1) y FlgL (HAP-3), FliS para FliC (filamento) y FliT para FliD (HAP-2) (Minamino, 2014). Estos componentes del aparato de exportación comparten similitudes

funcionales con los del sistema de secreción tipo III de bacterias patógenas, que inyectan factores de virulencia en células huésped (Minamino *et al.*, 2011).



**Figura. 21** Representación del aparato de exportación flagelar. El esquema señala a las proteínas integrales de membrana y citoplásmicas. (Imagen tomada/modificada de Fukumura *et al.*, 2017).

Se sugiere que las proteínas integrales de membrana FlhA y FlhB funcionan como una compuerta del aparato de exportación para que pueda llevarse a cabo el ensamblaje del flagelo. Interacciones del complejo soluble ATPasa (FliH, FliI, FliJ) con FlhA es mediada por FliH a través del dominio citoplásmico de FlhA en la base del flagelo y permite la exportación de los sustratos a través del canal central formado por las proteínas del aparato de exportación. La proteína FlhB funciona como un interruptor que controla el proceso de exportación según la etapa de ensamblaje del flagelo (Williams *et al.*, 1996). Cuando FlhB cambia la conformación del dominio citoplásmico,

también cambia su especificidad de sustratos a exportar: de gancho a filamento, este cambio de conformación es ocasionado por la proteína FliK (Minamino, 2014).

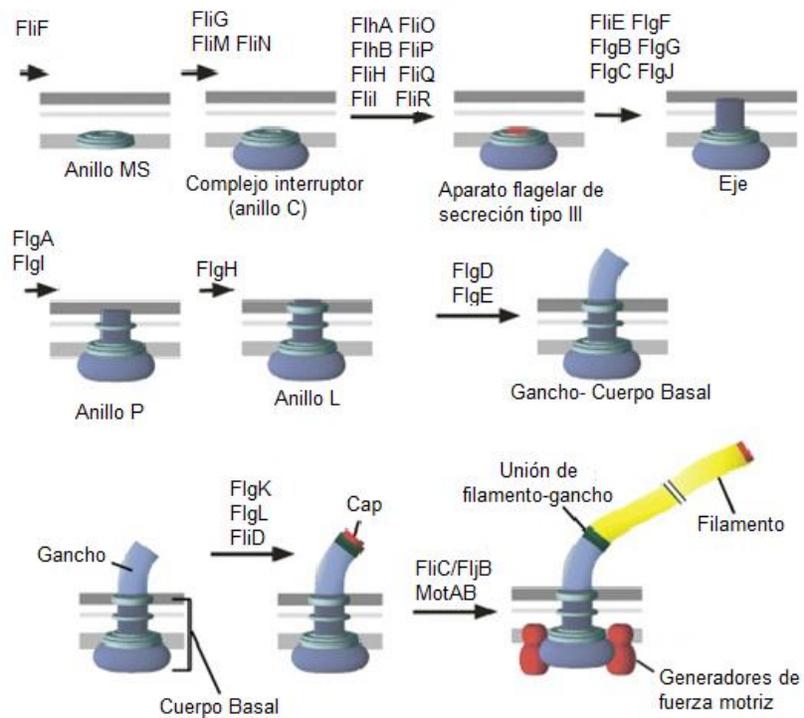
La proteína FliI con actividad ATPasa forma un complejo con FliH, formando entre sí un heterotrímero: FliH<sub>2</sub>FliI, la actividad ATPasa de FliI es regulada negativamente por FliH. (Terashima *et al*, 2008).

La proteína FliI es una ATPasa que muestra similitudes con la subunidades  $\alpha/\beta$  de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sintasa, no obstante, se ha estudiado que la hidrólisis de ATP suministra la fuerza para desplazar las proteínas al aparato de exportación. Sin embargo FliI no es indispensable para el proceso de exportación, sino que FliI sirve para hacer la exportación más eficiente (Minamino *et al.*, 2008; Terashima and Imada, 2018).

El desplazamiento de las subunidades flagelares que se sintetizan en el citoplasma sigue la siguiente dinámica: **i)** Primero las subunidades interaccionan con el complejo ATPasa donde se despliegan. **ii)** Sucesivamente, estas son presentadas a la región de exportación hacia la compuerta membranal. Algunas subunidades están acompañadas por chaperonas que se asocian al C-terminal de FlhA. Las chaperonas ayudan a establecer una interacción de alta afinidad con los componentes del sistema de secreción y ordenan el acomodo de las subunidades que se van a ensamblar en el flagelo naciente (Evans *et al.*, 2014).

## Biogénesis flagelar

El proceso de la biogénesis flagelar está estrictamente controlado en orden jerárquico, este proceso inicia con la adición secuencial de los componentes proximales a los distales, comenzando con el cuerpo basal, después el eje, el gancho y por último el filamento; los complejos del estátor se ensamblan una vez que el cuerpo basal está completo (**Figura 22**). Los modelos más estudiados para describir este proceso pertenecen a las bacterias *S. enterica* y *E. coli*.



**Figura 22.** Esquema morfológico del ensamblaje del flagelo. El ensamble inicia con la formación del anillo MS y el resto de las estructuras se añaden subsecuentemente en el extremo distal de la estructura naciente. El gancho y el filamento necesitan de sus respectivas chaperonas para polimerizar (Imagen tomada/modificada de Vonderviszt *et. al.*, 2013).

La primera estructura que se ensambla es el anillo MS formada por la proteína FliF, se ubica en la membrana interna formando dicha estructura y es la base sobre la cual el resto de los componentes flagelares se van a asociar. Algunas bacterias como: *V. cholerae*, *V. alginolyticus*,

*P. aeruginosa*, *C. jejuni* y *B. subtilis* necesitan de otras dos proteínas FlhG y FlhF, para poder controlar la localización del anillo MS.

Posteriormente la estructura que se asocia en la cara citoplásmica del anillo MS corresponde al anillo C conocido como el complejo “*switch*” que contiene tres componentes: FliG, FliM y FliN. Esta estructura es relevante en el ensamblaje debido a que se ha demostrado que las mutantes en los genes del complejo de “*switch*” ocasionan fallas en la construcción de estructuras subsecuentes. Las proteínas MotA y MotB interaccionan con FliG por lo que el ensamblaje del motor es posterior a la incorporación del anillo C (Aizawa, 1996; Vonderviszt *et al.*, 2013).

Sucesivamente comienza la formación del eje que consiste en la adición de varias proteínas, la primera que se adiciona es FliE que se ubica sobre el anillo MS e interactúa con FlgB por lo que se sugiere que FlgB es la segunda en ensamblarse, la tercera es FlgC, la cuarta en unirse es FlgF y por último la proteína FlgG (Fujii *et al.*, 2017).

Un estudio muestra que la proteína FliE no es un componente del eje si no un adaptador entre el anillo MS y el eje. La formación de un eje flagelar completo requiere de la proteína FlgJ para poder ensamblarse y penetrar la pared de peptidoglicano. La proteína FlgJ se exporta al espacio periplásmico a través del aparato de exportación flagelar y actúa como un andamio para el eje durante el crecimiento de este. (Aldridge *et al.*, 2006). Una vez que el eje crece al tamaño adecuado, se forma el anillo P constituido por la proteína FlgI. Sucesivamente se adiciona la proteína FlgH dando origen al anillo L que a su vez penetra la membrana externa. Las proteínas FlgI (anillo P) y FlgH (anillo L) son secretadas a través de la vía Sec usando una secuencia señal en su extremo N-terminal (Homma and Iino 1985). La formación del anillo P requiere el sistema Dsb (Dailey and Berg, 1993), que participa en la formación de enlaces disulfuro en el periplasma. La proteína FlgI contiene dos residuos de cisteína importantes para la estabilidad de la proteína. La formación del anillo P también necesita de la proteína FlgA que actúa como una chaperona periplásmica, permitiendo la reacción de polimerización de FlgI en el anillo P. (Therashima *et al.*, 2008). Posteriormente se ensambla el anillo L (FlgH). El complejo que forman los anillos L y P funciona como un forro ó rodamiento incapaz de rotar pero es relevante para la integridad del eje durante la rotación (DePamphilis and Adler, 1971).

Después de que se ha completado el cuerpo basal comienza la formación del gancho (FlgE) en la parte exterior de la célula. La proteína FlgE requiere de la proteína FlgD esta le proporciona la

capacidad de polimerizar. FlgD se incorpora en la punta de la estructura creciente y las subunidades de FlgE se ensamblan debajo de ella (Vonderviszt *et al.*, 2013).

El gancho requiere de la presencia de la proteína FliK y junto con FlhB controlan su longitud. Una vez que el gancho alcanza la longitud adecuada (55 nm) ocurre un cambio de especificidad en el aparato de exportación, de sustratos tempranos eje-gancho a sustratos tardíos tipo filamento. La proteína FliK es exportada al medio extracelular al finalizar el ensamblaje del gancho a tipo filamento (Erhardt *et al.*, 2011).

La proteína FlgD que sirve como tapa del gancho es reemplazada por HAPI, a continuación se unen HAP3 y HAP2 formando un complejo junto con el cuerpo basal y el gancho. Este complejo se forma antes de que inicie el ensamblaje de la flagelina que dará lugar a la formación del filamento. Los monómeros de flagelina viajan a través de un canal central (2.0 nm de diámetro) por un proceso de difusión (Vonderviszt *et al.*, 2013).

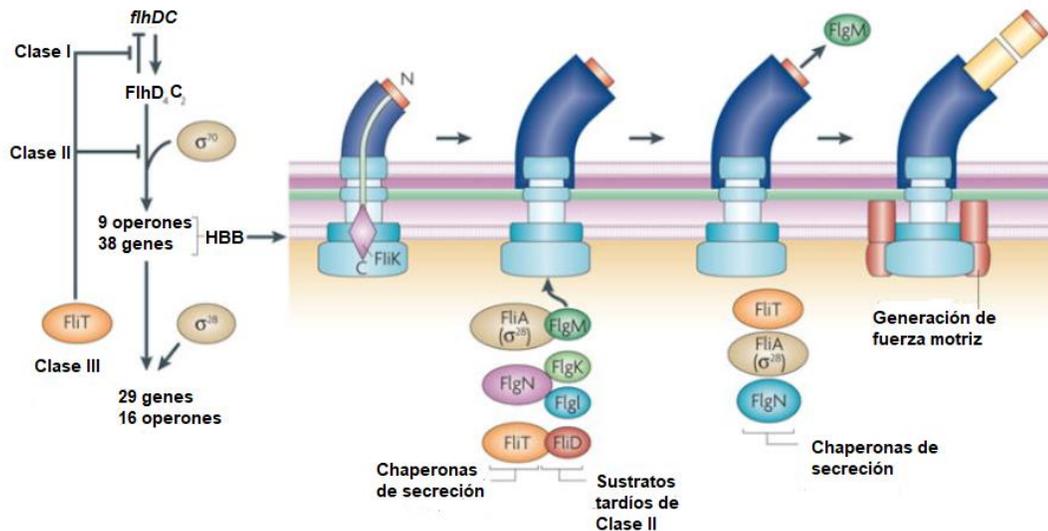
El ensamblaje del filamento requiere de HAP2 (FliD) que es la proteína que sirve de tapa y evita que la flagelina difunda al medio durante el proceso de ensamblaje. Subsecuentemente el filamento es construido por subunidades de FliC (Erhardt *et al.*, 2010).

## **Regulación de la biogénesis flagelar**

Para la formación de un flagelo funcional se requiere la expresión de más de 50 genes arreglados en 17 operones regulados coordinadamente que responden a señales ambientales y a señales que están acopladas al desarrollo morfológico flagelar. (Chilcott and Hughes, 2000). El flagelo es un orgánulo que consume el 2% de la energía celular durante su biosíntesis, por lo que la expresión de los genes flagelares está estrictamente regulada a nivel transcripcional de manera jerárquica. Los genes que participan en la biogénesis del flagelo de arreglo peritrico (flagelos laterales) están agrupados en tres clases, como es el caso de *S. enterica* y *E. coli*. A continuación, se describe la cascada de regulación flagelar.

El operón maestro *flhDC* se encuentra en el nivel superior de la jerarquía y además controla la producción de los flagelos, este operón se expresa a partir de un promotor de Clase I. Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo multimérico (FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) que funciona como un activador transcripcional que promueve la transcripción de los genes de la Clase II dependiente de  $\sigma^{70}$  que es una subunidad de ARN polimerasa que permite reconocer promotores de ADN para iniciar la

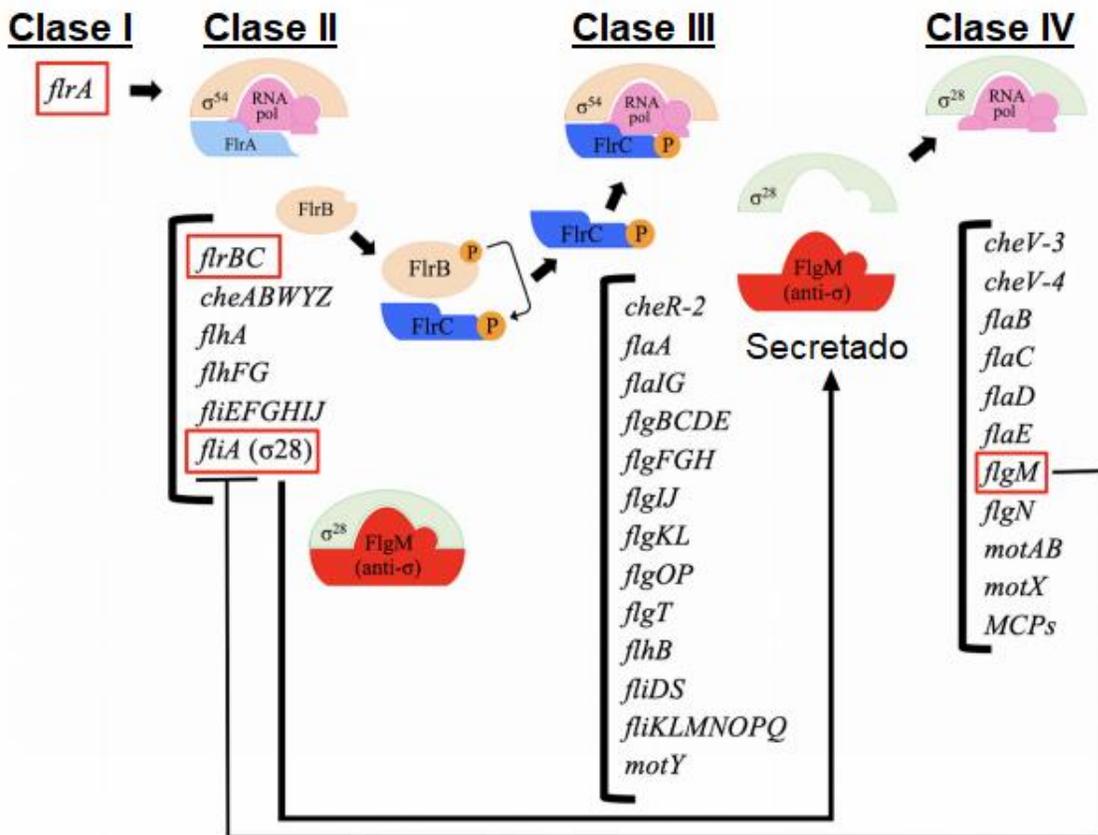
transcripción. Los promotores de Clase II dirigen la transcripción de los genes necesarios para la formación de la estructura gancho-cuerpo basal. Una vez que se ha completado el gancho, los sustratos de secreción tardía y sus chaperonas son exportadas. Las chaperonas FlgN y FliT regulan la expresión flagelar. FlgN aumenta la transcripción de FlgM, mientras que FliT previene la auto-represión del operón *flhDC* mediante la inhibición de FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> y la activación de los promotores de Clase II. Los promotores de la Clase III son transcritos por ARN polimerasa asociada a la proteína FliA (factor  $\sigma^{28}$ ) que es responsable del inicio de la transcripción de varios genes involucrados en la motilidad y la síntesis flagelar. Durante la construcción del complejo gancho-cuerpo basal FliA (factor  $\sigma^{28}$ ) es inhibido por el factor anti- $\sigma^{28}$  FlgM. Cuando se ha completado el complejo gancho-cuerpo basal la proteína FlgM es secretada al exterior de la célula permitiendo la liberación de FliA (factor  $\sigma^{28}$ ) y promoviendo la transcripción de los genes de la Clase III que codifican para las proteínas FlgK, FlgL, FliD y FliC al igual, que las proteínas del motor MotA, MotB y las proteínas que están involucradas en la quimiotaxis. (Soutourina and Bertin, 2003; Chevance and Huges, 2008) (Figura 23).



**Figura 23.** El operón maestro flagelar *flhDC*, está bajo el control de reguladores globales que conducen a la expresión o inhibición del gen flagelar. La inducción del operón *flhDC* de clase I (clase I activada) produce FlhD y FlhC, que forman un complejo multimérico, FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, que actúa para dirigir la transcripción dependiente de  $\sigma^{70}$  a transcribir los genes de Clase II y reprimir la transcripción de *flhDC* (Clase I: apagada/Clase II: prendida). Los promotores de los genes de Clase II dirigen la transcripción de los genes necesarios para la formación de la estructura gancho-cuerpo basal ó HBB (Hook-Basal- Body). Una vez que HBB está completo los sustratos de secreción tardía y sus chaperonas a fines son exportados para la regulación génica. FliT es una chaperona de FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> que previene la autorepresión y la activación de los genes de Clase II. El factor  $\sigma^{28}$  dirige la transcripción de los promotores de Clase III, esto incluye a los genes estructurales del filamento y a los genes quimiotácticos (Clase I: prendida/Clase II: apagada/ Clase III: prendida). La activación de la transcripción de Clase I reiniciaría a la región flagelar para una nueva ronda de expresión de los genes flagelares (Imagen tomada/modificada Chevance and Huges, 2008).

Por otra parte, existen bacterias en las cuales la cascada de transcripción flagelar está dividida en cuatro clases como en *C. crescentus*, *Vibrio spp.*, *P. aeruginosa* y *A. hydrophila* (Therashima *et al.*, 2008; Echazarreta and Klose, 2019).

La jerarquía de transcripción flagelar en vibrios ha sido ampliamente estudiada en *V. cholerae* y esta requiere de la proteína RpoN (factor  $\sigma^{54}$ ) y la proteína FliA (factor  $\sigma^{28}$ ) (Zhu *et al.*, 2013) (**Figura 24**).



**Figura 24.** Esquema de la jerarquía de la transcripción flagelar de *V. cholerae*. Los genes flagelares de *V. cholerae* se agrupan en cuatro clases. La cascada inicia con la transcripción del gen Clase I *flrA* que es el regulador maestro. Los genes de Clase II codifican para proteínas del cuerpo basal, para las proteínas reguladoras FliB y FliC que controlan la expresión de los genes de la Clase III. Los genes de la Clase III incluyen genes que codifican para el cuerpo basal, componentes del aparato de exportación, gancho y filamento y FliA ( $\sigma^{28}$ ) que transcribe los genes de la clase IV. En la Clase IV se encuentran genes que codifican para las flagelinas adicionales componentes del estator, proteínas de quimiotaxis, y de los quimiorreceptores MCP's, así como el factor anti-sigma FlgM. (Imagen tomada/modificada de Echazarreta and Klose., 2019).

La biogénesis comienza con el gen único de la Clase I *flrA* cuyo producto, es el activador de RpoN (factor  $\sigma^{54}$ ). *flrA* es el regulador maestro de la jerarquía flagelar en *V. cholerae*, sin esta proteína no se expresan los genes flagelares. FlhG, controla el número de flagelos y regula negativamente la transcripción de *flrA*. La activación de los genes Clase II está modulada por C-di-GMP-cíclico, que se une directamente a FlrA interrumpiendo la unión con los promotores, de Clase II, lo que impide su transcripción (Tsang and Hoover, 2014).

Los genes de la Clase II codifican para el anillo MS (FliF), anillo C (FliG, FliM y FliN), el complejo ATPasa (FliH, FliI y FliJ) y para el aparato de exportación (FlhA), asociado a la membrana citoplasmática, con FlhF y FlhG que determinan la ubicación y número de flagelos respectivamente, y la maquinaria de quimiotaxis (CheA, CheB, CheW, CheY y CheZ), así como a las proteínas FlrB, FlrC y FliA ( $\sigma^{28}$ ). Cuando se termina de ensamblar todas estas estructuras el sistema de dos componentes FlrC/FlrB se activa, la cinasa sensora de histidina FlrB transfiere un grupo fosfato a un residuo de aspartato conservado (Asp54) en el extremo N-terminal del regulador de respuesta FlrC el cual activa la transcripción dependiente de  $\sigma^{54}$  de los genes de la Clase III. (Therashima *et al.*, 2008).

En el grupo de genes de la Clase III codifica para el cuerpo basal, los componentes membranales del aparato de exportación (FliO, FliP, FliQ, FliR y FlhB), eje (FlgB, FlgC, FlgF, FlgG y FlgJ), anillo P (FlgI), anillo L (FlgH), anillo H (FlgO, FlgT y FlgP), anillo T (MotY), el generador de torque (FliL), gancho (FlgE, FlgD, FlgK y FlgL), la proteína que controla la longitud de gancho (FliK), proteína de coronamiento del filamento HAP-2(FliD), la chaperona de flagelina (FliS), una proteína de quimiotaxis (CheR-2), proteínas de función desconocida (FlalG y VC1384) y la flagelina mayoritaria FlaA. (Echazarreta and Klose, 2019).

La transcripción de los genes Clase IV dependen de FliA (factor  $\sigma^{28}$ ) incluye genes que codifican para las flagelinas adicionales (FlaB, FlaC, FlaD y FlaE), para las genes del estátor (PomA y PomB), parte del anillo T (MotX) y genes de los quimiorreceptores (MCP's) (Echazarreta and Klose, 2019). También se encuentra FlgM (factor anti- $\sigma^{28}$ ) cuya función es secuestrar a FliA ( $\sigma^{28}$ ) hasta que el cuerpo basal y el gancho se hayan completado. Una vez que el complejo gancho-cuerpo basal se completa, el aparato de exportación secreta a FlgM (factor anti- $\sigma^{28}$ ) al medio extracelular liberando a FliA ( $\sigma^{28}$ ) para iniciar la transcripción de los genes Clase IV (Prouty *et al.*, 2001; González *et al.*, 2015).

## Quimiotaxis, reorientación y nado sesgado

Durante la quimiotaxis las bacterias perciben señales ambientales a través de los sistemas de dos componentes (Two Component Systems). Estos sistemas constan de una proteína sensora conocida como cinasa de histidina (HPK) y un regulador de respuesta (RR) (Krell *et al.*, 2011). Estos sistemas les permiten nadar hacia condiciones favorables (atrayentes), o alejarse de ambientes tóxicos (repelentes). El cambio de la dirección de rotación del motor del flagelo es la principal función de la quimiotaxis. La bacteria *E. coli* tiene un solo sistema quimiotáctico y existen microorganismos como *R. sphaeroides* y *V. cholerae* que poseen tres sistemas quimiotácticos (Briegel *et al.*, 2016).

La quimiotaxis se lleva a cabo por un complejo de sistema de transducción de señales que inicia en el espacio periplásmico. Los quimiorreceptores son proteínas diméricas transmembranales que transmiten la señal al interior de la célula hacia el motor flagelar. Existen seis proteínas que modulan la cascada de la quimiotaxis: CheA, CheY, CheW, CheB, CheR y CheZ. La cascada de señalización quimiotáctica es muy compleja ya que el número de proteínas involucradas depende de la especie bacteriana. Por otra parte los reguladores de respuesta generalmente tienen libertad para difundirse alrededor del citoplasma, y unirse a proteínas motoras regulando el efecto *tumble*.

A continuación, se describe la función de cada proteína involucrada en la cascada de la quimiotaxis.

La proteína CheA es una HPK que está compuesta por cinco dominios funcionales designados como P1 a P5, y cada uno tiene una función específica. P1 pertenece a una familia de proteínas que son intermediarios en la transferencia de grupos fosforilo provenientes de ATP; P2 contiene el sitio de autofosforilación: histidina 48. Al unirse el dominio P2 a CheY se transfiere un grupo fosfato del dominio P1 hacia CheY; P3 es el dominio de dimerización de CheA y P4 es el dominio de unión a ATP. El dominio P5 se une a CheW que regula la unión de los quimiorreceptores. Una vez que se unen estos dos complejos se transfiere un  $\gamma$ -fosfato del ATP a la histidina conservada de CheA ocasionando una reacción de trans-autofosforilación (Ringgaard *et al.*, 2018).

La proteína adaptadora CheW es esencial para la transducción de señales y está compuesta por dos dominios similares a Src-Homology 3 (SH3) que es una cinasa de tirosina que produce señales intracelulares. Cada dominio de SH3 se compone de aproximadamente de 60 aminoácidos,

estos regulan la actividad de proteínas adaptadoras y vías celulares como la proliferación y migración celular (Kurochkina and Guha, 2013). CheW interactúa tanto con el dominio de señalización del MCP como con CheA dando origen al complejo ternario MCP – CheW – CheA en el polo de la célula. CheW carece de actividad catalítica, por lo tanto, se sugiere que funciona como proteína de andamiaje que transduce las señales generadas por los quimiorreceptores haciéndolas llegar hasta la proteína CheA (Wadhams and Armitage, 2004).

La proteína CheY es un RR que se une al dominio P2 de CheA y es fosforilada a un residuo invariablemente conservado de Asp57. CheY en su estado fosforilado (CheY-P) tiene una afinidad disminuida por CheA pero aumenta su afinidad al interactuar con FliM en el motor flagelar.

CheY-P se une primero al dominio N-terminal de FliM (FliM<sub>N</sub>) y después al dominio intermedio de FliM (FliM<sub>M</sub>), desplazando de manera competitiva al dominio C-terminal de FliG (FliG<sub>C</sub>), el cual modula la interacción entre FliG y MotA que conduce a un cambio en la dirección de rotación en sentido CCW a CW que a su vez causa que la célula se reoriente (Dyer *et al.*, 2009).

La proteína CheR es una transferasa ó receptor que metila de cuatro a seis residuos de glutamato a partir de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) en el proceso de adaptación (Simms *et al.*, 1985).

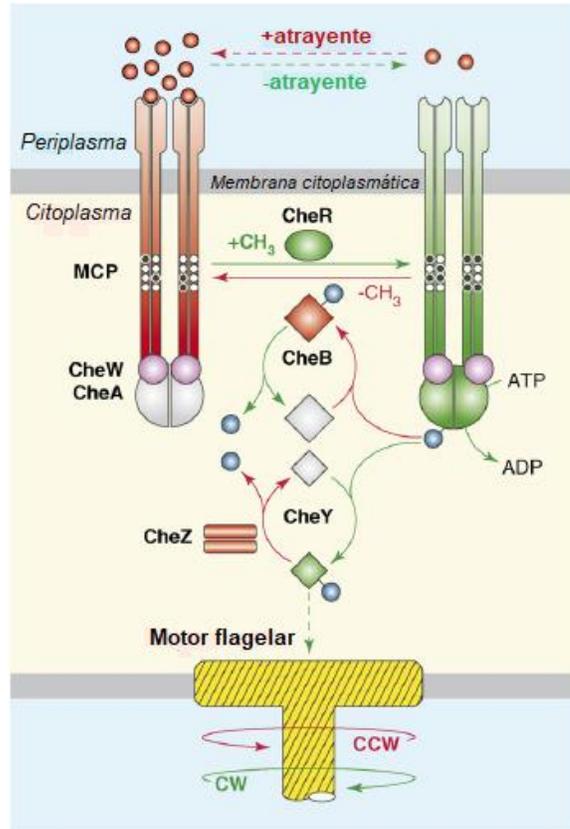
La proteína CheB es una metilesterasa que se activa por la fosforilación de CheA en un residuo de Asp56 en su dominio N-terminal; este dominio inhibe la actividad de metilesterasa cuando no es fosforilada y al estimular su actividad cuando está fosforilada. El dominio C-terminal de la enzima desmetila residuos de glutamato que se encuentran en el dominio citoplásmico de los quimiorreceptores (Jurica *et al.*, 1998).

La proteína CheZ es una fosfatasa que estimula la desfosforilación del RR de CheY-P, terminando así con la señal en la vía de señalización en *E. coli* (Ringgaard *et al.*, 2018).

El modelo más estudiado para explicar la quimiotaxis es en la bacteria *E. coli*. En esta cascada de señalización los receptores median el comportamiento de seguimiento de un gradiente a través de complejos de señalización. Como se mencionó anteriormente en el polo de la célula se encuentran los receptores y están organizados en trímeros de dímeros que forman complejos ternarios con CheA y CheW tienen dos estados de actividad quinasa “quinasa activada” y “quinasa desactivada”, estos dos estados reflejan una interacción dinámica entre los receptores y la metilación. Los cambios de unión a ligandos cambian la distribución de equilibrio de los complejos de señalización para iniciar respuestas motoras y poner en marcha un proceso de retroalimentación.

La cascada de señalización en *E. coli* inicia con la proteína CheA que fosforila dos RR: CheY y CheB, con la finalidad de promover un equilibrio en el sistema de quimiotaxis. (Krell *et al.*, 2011). CheY controla la dirección de rotación y CheB regula la adaptación sensorial de las MCP's. Cuando CheY está en estado fosforilado (CheY-P) se une a la proteína FliM del complejo “switch” aumentando la probabilidad de rotación en sentido CW, esto provoca cambios de dirección aleatorios. La rotación en sentido CCW produce que el nado de la bacteria sea hacia delante. Cabe mencionar que cuando existe mayor concentración de atrayente se inhibe la autofosforilación de CheA, lo que reduce la concentración de CheY-P provocando la reorientación en sentido CW durante más tiempo. Sin embargo, cuando la concentración del atrayente es menor, da como resultado una disminución de la unión del atrayente a los MCP's, lo que estimula la trans-autofosforilación de CheA.

La señal es finalizada cuando CheY-P es desfosforilada permitiendo que la célula detecte un gradiente continuo en el medio, esta desfosforilación regulada por la fosfatasa CheZ, garantizando la terminación rápida de la señal, de modo que CheY-P siga la señal de CheA modulada por el receptor “quinasa activada”. Por otra parte CheB-P es una metilesterasa que desmetila las moléculas de MCP's para cambiarlas al estado CCW “quinasa desactivada”. La metiltransferasa CheR aumenta la metilación de los MCP's. Las MCP's altamente metilados son capaces de estimular la autofosforilación de CheA, incluso en presencia continua de un quimioatrayente, esto devuelve la autofosforilación de CheA reiniciando la cascada de la quimiotaxis (Hazelbauer *et al.*, 2008).

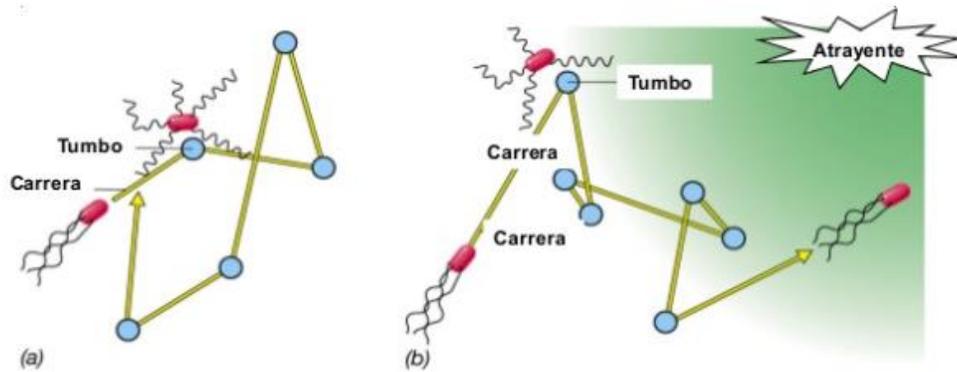


**Figura 25.** Esquema de la vía de señalización en *E. coli*. Las reacciones en rojo promueven la rotación flagelar en sentido CCW; los que están en verde promueven la rotación flagelar en sentido CW. Los componentes en gris representan formas inactivas. Las líneas continuas representan reacciones enzimáticas; Las líneas discontinuas indican interacciones vinculantes. Los grupos fosforilo derivados de CheA se muestran esferas azules. Los sitios de modificación del receptor se muestran círculos blancos (no metilados) y negros (metilados) (Imagen tomada/modificada de Hazelbauer *et al.*, 2008).

En *E. coli* como consecuencia de la cascada de quimiotaxis las bacterias poseen patrones de nado, uno de ellos se conoce como “run” (Zhu *et al.*, 2017; Whadams and Armitage *et al.*, 2004). La rotación en sentido CCW provoca que los filamentos formen una trenza que impulsa a las células hacia el frente en una carrera “run” a una velocidad de 10-30  $\mu\text{m/s}$ . Un cambio en la dirección del nado ocurre cuando uno o más motores cambian el sentido de giro y se produce la reorientación de la célula a esto se le conoce como “tumbo” ó “tumble” (Yonekura *et al.*, 2003).

Cuando está presente un atrayente en el medio las trayectorias de nado son más largas y los eventos de reorientación de la célula son menos frecuentes a esto se le denomina “nado sesgado”.

En presencia de un atrayente o el incremento de este, ocasiona que los flagelos de la bacteria roten más tiempo en dirección CCW y menos tiempo en dirección CW originando que la bacteria se desplace hacia el atrayente (**Figura 26**) (Brock *et al.*, 2003).



**Figura 26.** Comportamiento quimiotáctico de una bacteria en distintas condiciones. **A)** Nado azaroso, la célula se desplace aleatoriamente sin una dirección fija. **B)** Nado sesgado, la bacteria detecta un atrayente y se desplace hacia esa dirección (Imagen tomada/modificada de Brock *et al.*, 2003).

## 2. ANTECEDENTES

### **El primer patógeno descrito, y descubrimiento de especies no patógenas dentro del grupo de los vibrios**

Los registros de una enfermedad similar al cólera pueden ser rastreados desde los tiempos de Hipócrates (460 a 377 a.C) (Blake 1994). En 1854, el médico italiano Filippo Pacini (1812 a 1883) descubrió a *Vibrio cholerae*, causante del cólera. Además, indicó que el cólera era una enfermedad contagiosa, pero en ese momento la mayoría de los científicos y médicos creían en la teoría de la enfermedad del aire pestilente. En el mismo período, John Snow (1813 a 1858), estudió la epidemiología del cólera en varias ciudades de Inglaterra. Según Snow, el cólera era propagado por un "veneno mórbido que ingresó al canal de agua potable", por lo que recomendó la provisión de agua pura del grifo (Thompson *et al.*, 2004).

Casi 30 años después, Robert Koch (1843 a 1910) obtuvo cultivos puros de *V. cholerae* en placas de gelatina. En agosto de 1883, Koch y su equipo de investigación fueron a Egipto, donde el cólera había causado aproximadamente 100,000 muertes. En Alejandría, examinaron una serie de casos fatales y encontraron una bacteria característica en el tejido del intestino, pero no fueron capaces de hacer crecer al organismo. Después, fueron a la India, y a finales del año 1883 lograron obtener cultivos puros de *V. cholerae*, la describieron como sigue: "Está ligeramente doblada, se asemeja a una coma o un espiral, es muy móvil y forma enjambres en las placas de gelatina". Llegaron a la conclusión de que era el causante del cólera. En 1893, se produjo un brote de cólera en Hamburgo, Alemania, con alrededor de 8,000 casos fatales. Se le solicitó a Koch que estudiara los medios para mejorar la higiene en esa región. Propuso que los sistemas de suministro de agua deberían incorporar filtración de agua potable para eliminar las bacterias. En ese momento, Koch y su equipo de investigación también se dieron cuenta de que los vibrios eran ubicuos en entornos acuáticos y que muchas especies de vibrios no eran patógenas para los humanos. Las primeras especies del género *Vibrio* no patógenas registradas fueron: *V. fischeri*, *V. splendidus*, y *P. phosphoreum*, se aislaron del ambiente acuático, y fueron descubiertos por el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck (1851 a 1931) a fines de la década de 1880.

Actualmente se reconocen 142 especies descritas dentro de la familia *Vibrionaceae* distribuidas en 12 géneros: *Aliivibrio*, *Allomonas*, *Beneckeia*, *Catenococcus*, *Echinimonas*,

*Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Lucibacterium*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, y *Vibrio* (Boyd *et al.*, 2015), basados en las secuencias 16S ARNr, indica que estos géneros comparten un ancestro común. Las bacterias de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*, se encuentran entre las primeras bacterias descubiertas y descritas de la familia *Vibrionaceae*. (Thompson *et al.*, 2005a; Shikongo-Nambabi *et al.*, 2012).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, para las bacterias, la motilidad representa una ventaja adaptativa que les permite avanzar a ambientes nutritivos o alejarse de los tóxicos, colonizar nichos ecológicos e invadir al hospedero por medio del flagelo. Este organelo participa de manera importante en la interacción bacteria-hospedero y es considerado como un factor de virulencia o como determinante de simbiosis. Durante la simbiosis el flagelo juega un papel valioso en las bacterias del género *Vibrio*, ya que en ambientes líquidos expresan su único flagelo polar, mientras que en superficies sólidas o semisólidas algunos vibrios expresan los flagelos laterales.

Las bacterias *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* se han relacionado con altas tasas de mortalidad de organismos marinos e incluso en el ser humano, dado que la motilidad bacteriana está relacionada con la virulencia. La bacteria *V. shilonii* está muy relacionada en la patogénesis del coral *O. patagonica*, este microorganismo ocasiona el blanqueamiento y la muerte del coral durante la estación de verano. La importancia ecológica para el estudio de este microorganismo radica en que los arrecifes de coral son muy importantes ya que protegen las costas de la erosión causada por el océano, así mismo proveen su salud, filtrando desechos y toxinas producidas por la fauna marina; además proveen la principal fuente de turismo y se han convertido en un recurso valioso para el descubrimiento de nuevos medicamentos en la industria farmacéutica.

La bacteria *V. harveyi* es potencialmente virulenta en varios organismos marinos como: corales, bivalvos, ostras, langostas, peces, caballitos de mar y en el camarón. Cuando el camarón es infectado por *V. harveyi* tiene un impacto negativo en el desarrollo de la fase larvaria de este causando pérdidas económicas a nivel mundial.

Por otra parte *V. alginolyticus* posee importancia económica y médica, es patógeno de peces, bivalvos y humanos. Las infecciones en humanos son provocadas por el consumo de productos marinos infectados o por exposición de heridas al agua de mar contaminada por este microorganismo.

Desafortunadamente se conoce muy poco sobre la motilidad de estas bacterias. En este trabajo se propone estudiar la motilidad de tres bacterias *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, de manera que incrementará el conocimiento en la descripción del comportamiento de nado bajo diferentes concentraciones de NaCl en un rango de salinidad más amplio del que reporta González *et al.*, 2015.

En el estudio publicado por González *et al.*, 2015 se determinó la capacidad de nado de *V. shilonii* bajo dos concentraciones salinas: 120 mM y 342 mM de NaCl, así mismo se muestra un experimento donde realizaron dos curvas de crecimiento y observaron que ambas se comportan de manera similar en las dos concentraciones de NaCl. Finalmente concluye en el experimento que el NaCl es un factor dependiente para que las bacterias naden más al incrementar la concentración de NaCl.

Adicionalmente en esta tesis se determinará las relaciones estructurales de parentesco entre vibrios, a partir de un análisis bioinformático con las proteínas del estator PomA y PomB.

## 4. HIPÓTESIS

El flagelo de los vibrios es capaz de rotar mediante un gradiente electroquímico de iones Na<sup>+</sup>, estandarizar diversas concentraciones de NaCl causará diferentes comportamientos en el fenotipo del nado, crecimiento bacteriano y velocidad del nado en las células de vibrios.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Describir el comportamiento de la motilidad de tres bacterias marinas del género *Vibrio* (*V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*) en diferentes concentraciones de NaCl.

### Objetivos particulares

- Observar el fenotipo de la motilidad de tres bacterias marinas del género *Vibrio* en cultivo semisólido a partir del nado “*swimming*” bajo seis diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 175 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM).
- Establecer el comportamiento de crecimiento en medio de cultivo líquido a partir de la obtención de curvas de crecimiento en tres diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM).
- Determinar la velocidad del desplazamiento ( $\mu\text{m/s}$ ) de tres bacterias marinas del género *Vibrio* en medio de cultivo líquido a partir del nado “*swimming*” bajo tres concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM), por medio de microscopía óptica de campo oscuro de alta intensidad.
- Realizar un análisis bioinformático con las secuencias de las proteínas PomA y PomB de catorce bacterias de vibrios con la finalidad de observar sus relaciones evolutivas y estructurales.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas y medios

Los experimentos se realizaron con tres cepas del género *Vibrio* (*V. shilonii* AK-1, *V. harveyi* BB120 y *V. alginolyticus* VIO5). Las células se crecieron en cajas Petri que contenían 2.0% de Bacto-agar disuelto en una solución soluble en agua que contenía 3.7% de medio MB (Difco) y se incubaron durante 24 horas a 30°C.

Para la preparación del medio de cultivo “Marine Broth 2216” de la marca Difco 3.7 % (p/v). Se disolvió calentando hasta observar su ebullición, con agitación, durante 1 minuto. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

El medio de cultivo líquido conocido como agua de mar a base de triptona (TBSW) está compuesto por triptona al 1%, MgSO<sub>4</sub> 35 mM, CaCl<sub>2</sub> 7 mM, KCl 7 mM y NaCl, este último con la concentración que se desee ocupar (120 mM, 175 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM) (O'Shea *et al.*, 2005).

### Ensayos de desplazamiento en agar semisólido

Para cada cepa se prepararon cajas Petri en medio semisólido que contenía 0.25% de Bacto-agar disueltos en medio TBSW, en siete diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 175 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM), así mismo para cada cepa se elaboró un cultivo de 2 ml de medio TBSW a una concentración de 120 mM de NaCl y fueron crecidos en las siguientes condiciones: durante la noche, incubados a 30°C y en agitación orbital a 230 rpm. De estos cultivos se tomaron 3 µl, para ser inoculados en las cajas Petri, previamente preparadas y se incubaron durante 8 horas a 30°C en oscuridad. El diámetro del halo formado por el desplazamiento se midió mediante el programa “imageJ” (Schneider *et al.*, 2012).

## Curvas de crecimiento

Las bacterias se crecieron en medio líquido TBSW a una concentración 120 mM de NaCl en un volumen de 2 mL, se incubaron a 30°C en agitación orbital a 230 rpm durante la noche. Se tomó 1/100 de cada cultivo para ser inoculados en 10 mL de medio líquido TBSW en tres diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM). El crecimiento se midió por la lectura de densidad óptica de cada uno de los cultivos a una longitud de 600 nm en intervalos de 1 hora.

## Videos

Para cada población bacteriana se realizaron tres cultivos en medio líquido TBSW a una concentración 120 mM de NaCl en un volumen de 2 mL se incubaron a 30°C en agitación orbital a 230 rpm durante la noche. Se tomó 1/100 de cada cultivo para ser inoculados en 10 mL de medio líquido TBSW en tres diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM).

Cuando los cultivos alcanzaron una  $OD_{\lambda=600\text{ nm}}=0.6$  se tomó una muestra para observar al microscopio de campo oscuro de alta intensidad y corroborar que las células estuvieran nadando, en este punto se tomó 3  $\mu\text{l}$  de cada cultivo y se colocó en el portaobjetos. Las muestras se observaron a través de un microscopio de campo oscuro de alta intensidad (*Olimpus* modelo BH2), al cual se le adaptó una cámara digital *Canon*, modelo HV20 (Macnab, 1976). Se buscaron los campos donde la densidad de células no fuera alta y posteriormente se capturaron en videos, con duración de 5 segundos, éstos se obtuvieron observando a las células tomadas directamente del cultivo. Los videos se editaron con el programa iMovie (Apple Inc.) y transformados al formato AVI. DV-Encoder NTSC (Microsoft 1992) con el programa Prism Video File Converter (NHC software). Se tomaron 6 videos de diferentes campos para cada cepa. Los archivos de vídeo generados se analizaron con el programa CellTrak 1.5 (Motion Analysis Corp., Santa Rosa, CA), con el cual se determinó la velocidad de células individuales. Los vídeos se procesaron utilizando los siguientes parámetros:

## Process image

- **Edge Detection Method: Binary Smoothed Edges (BSE).** En esta opción las células en movimiento se paralizan automáticamente, mostrando sus bordes en color negro en un fondo gris
- **Threshod Value: 25.** Elimina los bordes de objetos que estén por debajo de 25 píxeles.

## Metrics

- **Neighborhood size: 3.** Esta opción determina si los píxeles pertenecen al mismo objeto. Si un píxel está cerca de otro píxel, se considera que pertenecen al mismo objeto.
- **Maximum Object size: 300.** Se usa el número mayor de píxeles que un objeto puede poseer y aún se considera un objeto válido. Esto es útil para eliminar objetos grandes o pequeños no deseados.
- **Minimum Object Size: 30.** Se usa el número más pequeño de píxeles que un objeto puede poseer y aún se considera un objeto válido. Esto es útil para eliminar objetos pequeños no deseados.

## Tracking Parameters

- **Maximum Object Speed: 25 pixels/frame.** Se utiliza para identificar un objeto a través del tiempo. si este número es demasiado pequeño, es posible que no se encuentre la identidad de los objetos en el siguiente cuadro y su ruta se dividirá en

pequeñas rutas, si este número es demasiado grande, los objetos pueden ser identificados erróneamente y se conectarán rutas que no deberían estar.

- **Use prediction (señalar).** Este rubro predice la localización del objeto en el siguiente cuadro en función en la aceleración y velocidad.

Posteriormente el programa generó trayectorias del nado de las bacterias, las cuales fueron editadas manualmente, se siguió cada célula para corroborar que la trayectoria fuera correcta. Los objetos que se movieran a menos de 20 pixeles/segundo fueron descartados y se guardó el parámetro de velocidad. Las trayectorias fueron seleccionadas de manera que se observara en el campo visual trayectorias más prolongadas. A partir de dichas trayectorias el programa generó un archivo en Excel (Microsoft) donde fueron obtenidos los valores de la velocidad del desplazamiento de las células. Se estableció que cuando la velocidad instantánea fuera menor a  $11\mu\text{m/s}$  se había llevado el fenómeno de reorientación.

## **Análisis estadístico**

Una vez realizados los videos se analizaron 30 células de cada cepa (30 trayectorias). Con los datos generados se obtuvo el promedio de velocidad del desplazamiento de las células de cada población bacteriana. El análisis estadístico se realizó con el programa Excel (Microsoft). La significancia se evaluó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de T-student al 95% de confianza =  $\alpha: 0.05$ .

## **Análisis bioinformático**

Se buscaron catorce secuencias de la proteína PomA y PomB de vibrios que están reportadas en la base de datos NCBI la cual se puede encontrar en la siguiente dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Una vez obtenidas las secuencias se realizaron

alineamientos con estas secuencias. Los alineamientos presentados en este trabajo se realizaron con el programa MUSCLE (Edgar RC, 2004).

Finalmente se elaboró un árbol filogenético con catorce bacterias de vibrios, obteniendo las secuencias reportadas de 16S ADNr de cada integrante bacteriano y se usó como grupo externo *E. coli*. Las secuencias se pueden encontrar en una base de datos, en la siguiente dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. El árbol filogenético presentado en este trabajo se construyó utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud con el programa SeaView 4.

## 7. RESULTADOS

### Alineamientos múltiples de secuencias

Algunas bacterias pertenecientes al género *Vibrio* poseen un único flagelo (polar) para lograr desplazarse en ambientes líquidos como: *V. shlonii*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. cholerae*, *V. coralliilyticus*, *V. splendidus*, *V. mediterranei*, *V. rotiferanius*, *V. orientalis* y *E. norvegicus* (Yang *et al.*, 1983; McCarter, 2001; González *et al.*, 2010 and Tercero-Albuero *et al.*, 2014). Existen bacterias de este género que se desplazan en superficies sólidas o semisólidas, las cuales expresan flagelos con arreglo peritrico (laterales) y además poseen los dos tipos de flagelo como: *V. shilonii*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* y *V. orientalis* (Pujalte and Garay, 1986; McCarter, 2001; Gomez-Gil *et al.*, 2003, Munn, 2015) como se puede observar en la **Tabla 1**.

El motor del flagelo polar de estas bacterias requiere de las proteínas transmembranales PomA y PomB, para generar el torque del estator.

<b>Tabla 1.</b> Patrón de distribución flagelar en catorce especies del género <i>Vibrio</i> .			
<b>Especie</b>	<b>Flagelo polar</b>	<b>Flagelos peritricos</b>	<b>Referencia</b>
<i>V. shilonii</i>	+	+	González <i>et al.</i> , 2010
<i>V. harveyi</i>	+	+	McCarter, 2001
<i>V. alginolyticus</i>	+	+	McCarter, 2001
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	McCarter, 2001
<i>V. mimicus</i>	+	+	Tercero-Albuero <i>et al.</i> , 2014
<i>V. vulnificus</i>	+	-	McCarter, 2001
<i>V. fischeri</i>	+	-	McCarter, 2001
<i>V. cholerae</i>	+	-	McCarter, 2001
<i>V. coralliilyticus</i>	+	<b>ND</b>	Munn, 2015
<i>V. splendidus</i>	+	<b>ND</b>	Thompson <i>et al.</i> , 2003
<i>V. mediterranei</i>	+	-	Pujalte and Garay, 1986
<i>V. rotiferianus</i>	+	-	Gomez-Gil <i>et al.</i> , 2003
<i>V. orientalis</i>	+	+	Yang <i>et al.</i> , 1983
<i>E. norvegicus</i>	+	<b>ND</b>	Thompson <i>et al.</i> , 2005

Observación de los tipos de flagelos mediante microscopía electrónica. Flagelo presente (+), flagelo ausente (-) y **ND** (No determinado).

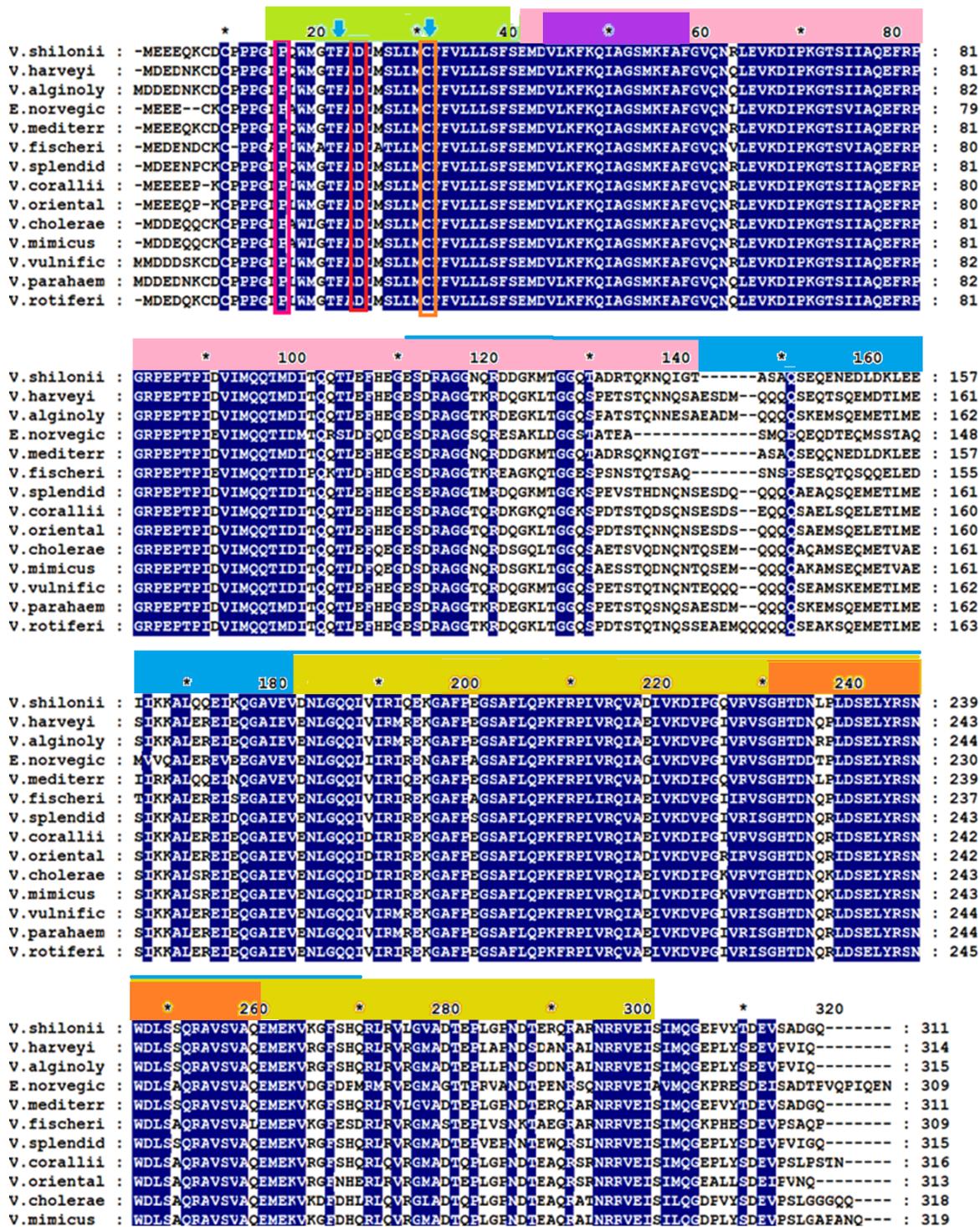
Con el objetivo de analizar las diferencias que existen entre las proteínas PomA y PomB, se llevó a cabo alineamientos múltiples de secuencias de catorce especies de vibrionaceas, donde se identificaron varias firmas moleculares, aminoácidos conservados y regiones que en conjunto desempeñan funciones en la rotación del flagelo (**Figura 27 y 28**).

Para este análisis los números de acceso de las secuencias utilizadas y publicadas en la base de datos GenBank se muestra en la tabla siguiente:

**Tabla 2. Números de acceso de proteínas del motor de Vibrios.**

<b>Especie</b>	<b>PomA</b>	<b>PomB</b>
<i>V. shilonii</i>	WP_031493735.1	WP_031493734.1
<i>V. alginolyticus</i>	AB004068.1:1138-2085	BAA20285.1
<i>V. parahaemolyticus</i>	TBT92873.1	AWG84794.1
<i>V. mediterranei</i>	WP_107306807.1	PRQ67666.1
<i>V. harveyi</i> 1DA3	EEZ86946.1	EEZ86945.1
<i>V. coralliilyticus</i>	WP_031493735.1	AXN32691.1
<i>V. cholerae</i>	CAH17907.1	CAH17908.1
<i>V. vulnificus</i>	QBN13256.1	QBN13257.1
<i>V. splendidus</i>	WP_108338723.1	KPL93867.1
<i>V. mimicus</i> CAIM 602	EMB48372.1	EMB48371.1
<i>V. fischeri</i>	TGA71670.1	KLU77742.1
<i>V. orientalis</i> CIP 102891 =ATCC 33934	EGU45160.1	EEX91657.1
<i>V. rotiferianus</i> CAIM 577 =LMG 21460	PIB17828.1	PIB17829.1
<i>E. norvegicus</i> FF-33	OEE69894.1	OEE69895.1





**Figura 28.** Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína PomB de catorce bacterias del género *Vibrio*. Se marcan en azul los aminoácidos conservados, en verde la región que corresponde a la hélice transmembranal, en morado la región “plug”, en rosa la región de “linker”, en azul claro la región PEM (*Periplasmic region Essential for Motility*) en naranja la región OmpA y en amarillo el dominio de unión a peptidoglicano. Se enmarcan los aminoácidos más importantes: en rojo el Asp24, en naranja Cys31 y en magenta Pro16, se señalan en flechas azules los aminoácidos que conforman el canal iónico y que a su vez están involucrados en la translocación iónica. El alineamiento fue realizado con el programa MUSCLE.

Los alineamientos de secuencias de las proteínas PomA de los vibrios se encontró que los aminoácidos Asp148, Leu183, Ans194, Thr158, Thr185 y Thr186 se encuentran bien conservados. Estos residuos de aminoácidos son importantes para la motilidad del flagelo (Onue et al., 2019) (**Figura 27**).

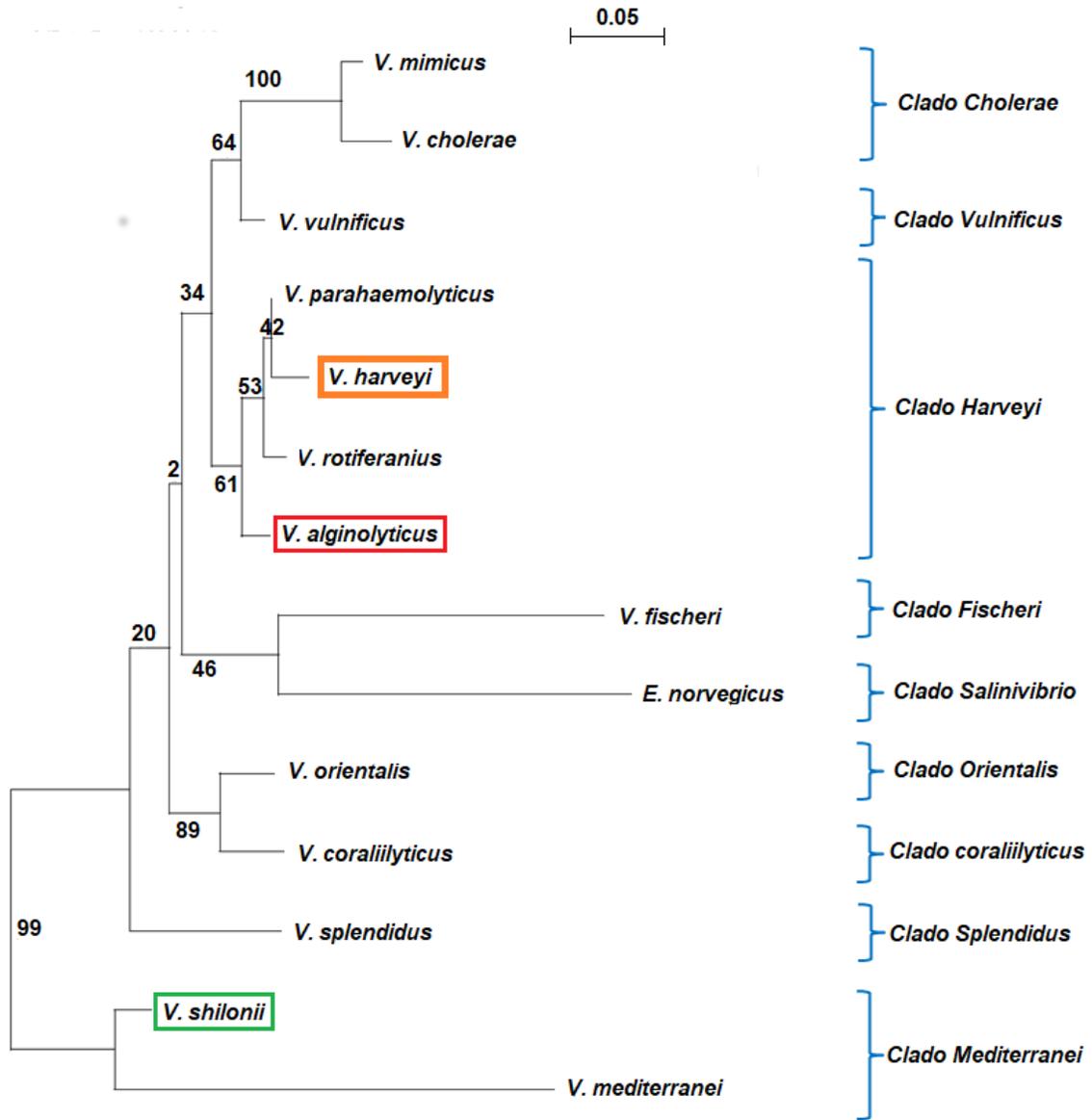
Para los alineamientos de secuencias de las proteínas PomB referentes a *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, se muestran algunos aminoácidos importantes para el funcionamiento de la motilidad del flagelo como: Pro16, Asp24 y Cys31, así mismo se observa el dominio transmembranal (que abarca los aminoácidos Gly20 a Ser40), el cual, se encuentra conservado. El dominio de unión a peptidoglicano se encuentra desde el aminoácido Ala97 hasta el aminoácido 294, este motivo de unión a peptidoglicano es altamente conservado, sin embargo, existe una región no conservada entre todas las proteínas alineadas (desde el aminoácido 120 al 160). También se encontró la región PEM (*Periplasmic region Essential for Motility*), esta región es importante para el flagelo de los vibrios (**Figura 28**).

Por otra parte, se identificó en las proteínas PomB la región “*plug*” que está conformada desde el aminoácido Val44 a Ala58. También se encontró la región “*linker*” entre los aminoácidos 121 a 131, el dominio de proteínas similares a OmpA que se asocia a la región del peptidoglicano la cual, abarca desde el aminoácido 182 al aminoácido 300 (Li et al., 2011b).

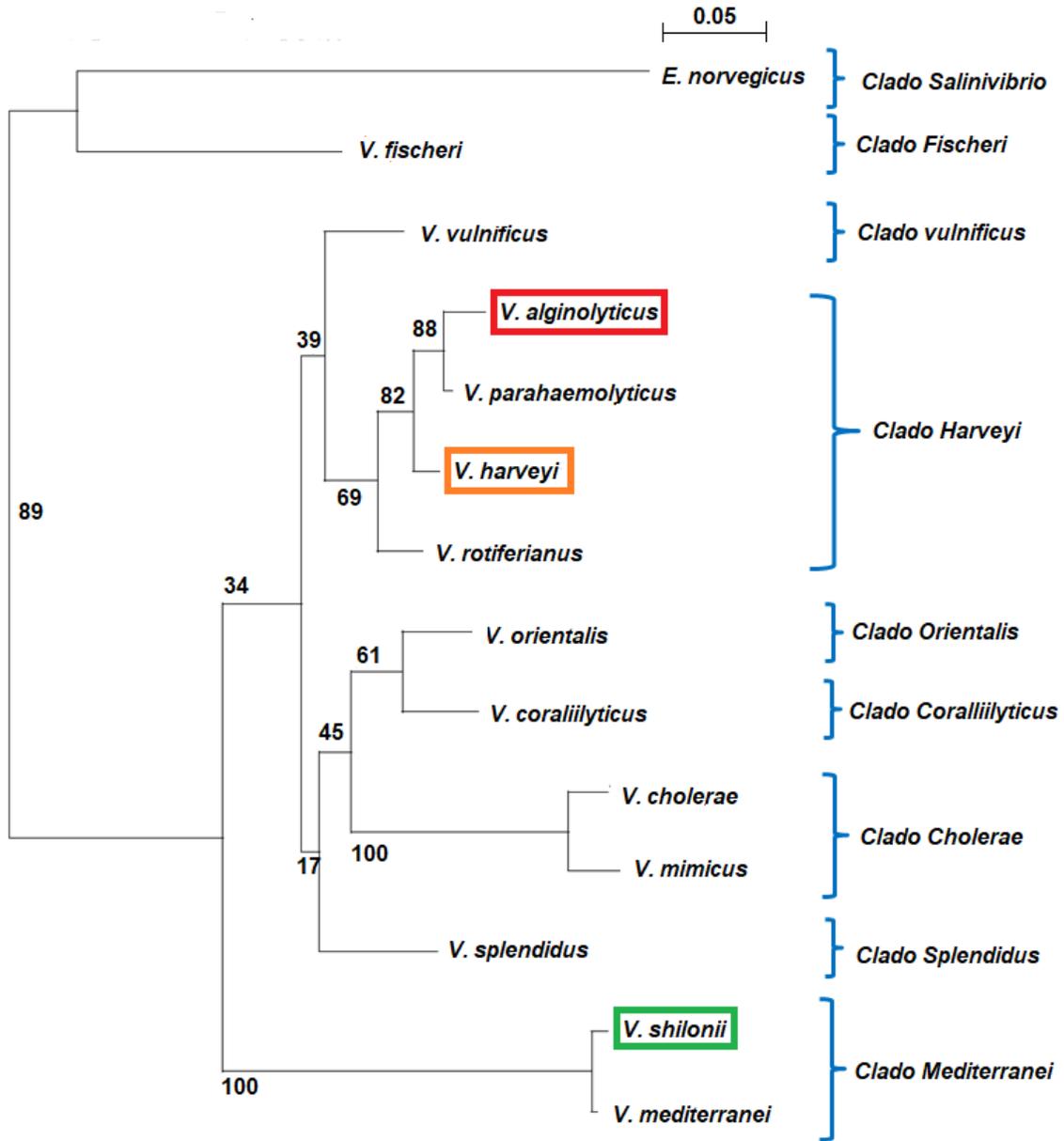
Al comparar las regiones y el dominio de proteínas similares a OmpA entre *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* se encontró que la región “*plug*” es totalmente conservada, mientras que la región “*linker*” es menos conservada. En el dominio de proteínas similares a OmpA se encuentra un segmento conservado, no obstante, en este mismo dominio se observa un segmento poco conservado que abarca del aminoácido 265 al 294 (**Figura 28**).

A partir de los alineamientos múltiples de las secuencias de las proteínas PomA y PomB encontradas en la base de datos se realizaron árboles filogenéticos con el algoritmo de máxima verosimilitud (maximun-likelihood) (**Figura 29 y 30**).

## Árboles Filogenéticos de las proteínas PomA y PomB



**Figura 29** Árbol filogenético de catorce vibrios, basado en la proteína PomA. Se enmarca en verde a *V. shilonii* que infecta al coral *O. patagonica*, en naranja *V. harveyi* el cual es un microorganismo bioluminiscente y en rojo el patógeno que perjudica principalmente al humano. El árbol filogenético fue realizado por el método de Likelihood (Maxima verosimilitud) con el programa SeaView 4.7. Los números en las ramas indican el bootstrap de 1000 réplicas.



**Figura 30** Árbol filogenético de catorce vibrios, basado en la proteína PomB. Se enmarca en verde a *V. shilonii* que infecta al coral *O. patagonica*, en naranja *V. harveyi* el cual es un microorganismo bioluminiscente y en rojo el patógeno que perjudica principalmente al humano. El árbol filogenético fue realizado por el método de Likelihood (Maxima verosimilitud) con el programa SeaView 4.7. Los números en las ramas indican el bootstrap de 1000 réplicas.

Los árboles filogenéticos de las proteínas PomA y PomB muestran en los nodos terminales los taxones ó especies del género *Vibrio* que están conectadas entre sí, por un ancestro en común. Las especies se encuentran agrupadas en nueve clados filogenéticos (*Salinivibrio*, *Fischeri*, *Orientalis*, *Coralilyticus*, *Cholerae*, *Vulnificus*, *Harveyi*, *Cholerae*, *Splendidus* y *Mediterranei*). Las bacterias de interés de este trabajo se encuentran enmarcadas como sigue: *V. shilonii* en verde, *V. harveyi* en naranja y *V. alginolyticus* en rojo.

El árbol filogenético correspondiente a las proteínas PomA de vibrionaceas (**Figura 29**), se observa en la parte superior el clado *Cholerae* compuesto por las especies *V. cholerae* y *V. mimicus*, posteriormente se encuentra el clado *Vulnificus* constituido por *V. vulnificus*. El clado *Harveyi* contiene a las especies: *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, seguido de este se encuentra el clado *Fischeri* conformado por *V. fischeri*, en seguida se muestra el clado *Salinidae* compuesto por *E. norvegicus*, estos dos últimos clados poseen una relación cercana.

Las bacterias *V. shilonii* y *V. mediterranei* se encuentran en el extremo inferior del árbol filogenético.

El árbol filogenético de las proteínas PomB de vibrionaceas (**Figura 30**) es similar a la agrupación del árbol filogenético de la **Figura 29** correspondiente a las proteínas PomA. En la parte superior del árbol se encuentra el clado *Salinivibrio* conformado por *E. norvegicus* en seguida se encuentra el clado *Fischeri* compuesto por *V. fischeri*, sucesivamente se muestra el clado *Vulnificus* representado por la especie *V. vulnificus*, posteriormente se observa el clado *Harveyi*, uno de los clados con más diversidad de vibrios, en este clado se encuentran las especies: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. rotiferianus*. Posteriormente se encuentran los siguientes clados: *Orientalis*, *Coralilyticus* conformados por las especies *V. orientalis*, *V. coralilyticus* respectivamente. Adicionalmente se muestra el clado *Cholerae* constituido por las especies: *V. cholerae* y *V. mimicus*. También se encuentra el clado *Splendidus* representado por *V. splendidus*. Finalmente se muestran las especies *V. mediterranei* y *V. shilonii* las cuales tienen una relación muy estrecha.

En este análisis se concluye gráficamente que las proteínas PomA y PomB de *V. harveyi* y *V. alginolyticus* existe un porcentaje de similitud más en comparación con *V. shilonii*

Con la finalidad conocer porcentualmente la relación de identidad de las proteínas PomA y PomB entre las catorce vibrios se obtuvo la matriz del alineamiento múltiple de secuencias. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 3 y 4**.

### Matrices de los alineamientos múltiples de secuencias

**Tabla 3.** Porcentajes de identidad de la proteína PomA de catorce bacterias de la familia *Vibrionaceae*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>E.norvegicus</i>	100													
2. <i>V.mediterranei</i>	66.14	100												
3. <i>V.fischeri</i>	75.49	69.32	100											
4. <i>V.shilonii</i>	75.89	80.48	78.35	100										
5. <i>V.splendidus</i>	78.66	74.10	78.74	83.07	100									
6. <i>V.coralliititicus</i>	80.16	72.91	78.57	83.73	88.89	100								
7. <i>V.orientalis</i>	79.84	72.91	78.32	83.46	88.58	94.05	100							
8. <i>V.cholerae</i>	79.05	72.11	78.74	82.68	84.25	88.10	88.98	100						
9. <i>V.mimicus</i>	79.84	73.31	80.31	83.46	86.22	88.10	88.58	96.06	100					
10. <i>V.vulnificus</i>	78.66	74.10	79.84	84.58	89.33	90.87	90.91	90.91	92.09	100				
11. <i>V.alginolyticus</i>	79.05	73.31	79.45	83.79	89.33	90.87	91.30	89.33	90.51	94.47	100			
12. <i>V.harveyi</i>	79.84	74.50	80.24	85.38	90.12	90.48	91.30	89.33	90.91	93.28	96.05	100		
13. <i>V.parahaemolyticus</i>	79.45	74.10	80.63	84.98	89.33	90.87	90.91	90.12	91.30	93.68	96.84	97.63	100	
14. <i>V.rotiferianus</i>	79.84	74.10	81.42	84.58	89.33	90.87	90.51	89.72	90.51	93.28	96.05	96.05	98.42	100

**Tabla 4.** Porcentajes de identidad de la proteína PomB de catorce bacterias de la familia *Vibrionaceae*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>E.norvegicus</i>	100													
2. <i>V.fischeri</i>	74.75	100												
3. <i>V.mediterranei</i>	72.52	72.17	100											
4. <i>V.shilonii</i>	72.52	71.84	98.71	100										
5. <i>V.cholerae</i>	72.46	72.17	78.46	78.46	100									
6. <i>V.mimicus</i>	72.88	73.14	78.78	78.78	94.97	100								
7. <i>V.coralliititicus</i>	72.28	77.27	80.00	80.00	84.49	85.13	100							
8. <i>V.orientalis</i>	73.33	76.87	79.94	79.94	83.71	84.66	92.97	100						
9. <i>V.splendidus</i>	71.85	75.73	79.94	79.42	81.90	83.71	88.22	87.54	100					
10. <i>V.vulnificus</i>	73.68	77.35	80.06	80.06	83.28	81.90	87.34	88.18	88.89	100				
11. <i>V.rotiferianus</i>	72.67	76.87	80.91	80.91	82.75	83.28	87.82	88.46	90.42	91.37	100			
12. <i>V.harveyi</i>	72.76	76.95	80.97	80.97	81.85	82.80	86.58	87.54	88.85	90.13	94.25	100		
13. <i>V.parahaemolyticus</i>	71.76	76.62	78.39	78.39	81.53	82.80	86.90	87.54	88.54	91.43	93.93	96.18	100	
14. <i>V.alginolyticus</i>	71.76	76.30	81.42	79.35	80.57	81.85	85.94	86.90	86.62	89.21	92.97	95.86	97.14	100

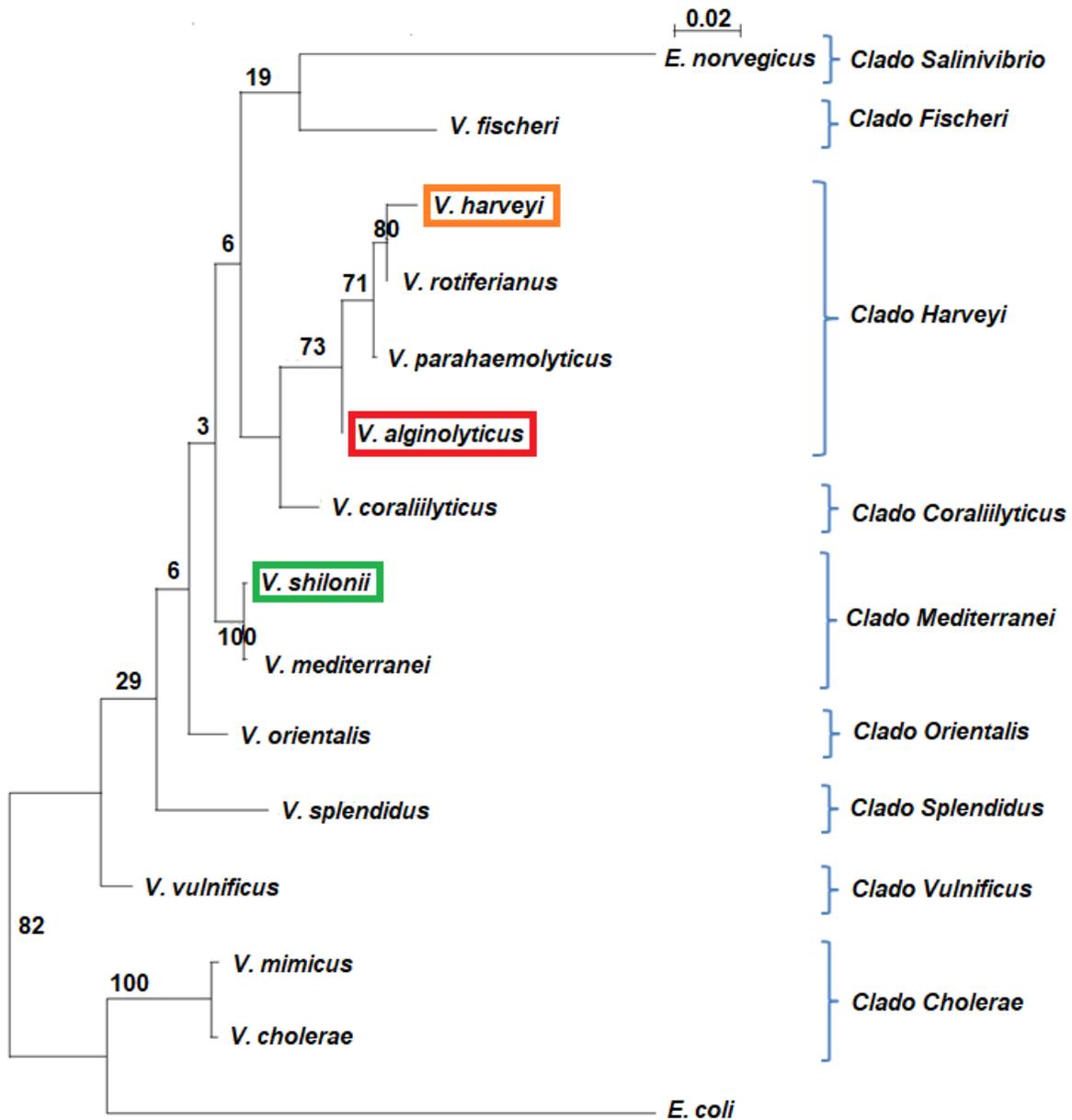
Las **Tablas 3 y 4** muestran de manera cuantitativa la identidad que existe entre las proteínas PomA y PomB de un grupo de catorce vibrios. El porcentaje de identidad de las proteínas PomA y PomB de *V. harveyi* y *V. alginolyticus* son similares (PomA 96% y PomB 95.6%) estos valores evidentemente coinciden con los resultados de los árboles filogenéticos de las **Figuras 29 y 30**.

*V. shilonii* está muy alejada de *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, sin embargo la matriz muestra que las proteínas PomA de *V. harveyi* y *V. shilonii* son idénticas en un 85.38% y en PomB 80.97%. Por otra parte al comparar *V. alginolyticus* con *V. shilonii* existe un 83.79% y 79.35% de identidad en las proteínas PomA y PomB respectivamente.

Los resultados demuestran que las proteínas PomA y PomB son altamente conservadas, de modo que *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* no divergen considerablemente entre sí. Posiblemente las proteínas son altamente expresadas y tienen restricciones estructurales que ocasionan que algunas regiones en las proteínas tiendan a evolucionar lentamente (Gaucher et al., 2002).

Para demostrar gráficamente la cercanía ancestral entre las catorce vibrionaceas se realizó un árbol filogenético con la subunidad 16S Admr., tomando como grupo externo a *E. coli* (**Figura 31**).

## Árbol filogenético con la subunidad 16S ADNr.



**Figura 31.** Árbol filogenético basado en secuencias de Admr. 16S, se muestra las relaciones entre 14 virios. Se enmarca en verde a *V. shilonia*, en naranja *V. Harvey* y en rojo *V. alginolyticus*. Se usó a *E. coli* como grupo externo. El árbol filogenético fue realizado por el método de Likelihood (Maxima verosimilitud) con el programa SeaView 4.7. Los números en las ramas indican el bootstrap de 1000 réplicas.

En el árbol filogenético se observan los vibrios agrupados en diferentes clados filogenéticos como: *Salinivibrio*, *Fischeri*, *Harveyi*, *Vulnificus*, *Cholerae*, *Corallilyticus*, *Orientalis* y *Splendidus* y *Mediterranei* (Sawabe *et al.*, 2007).

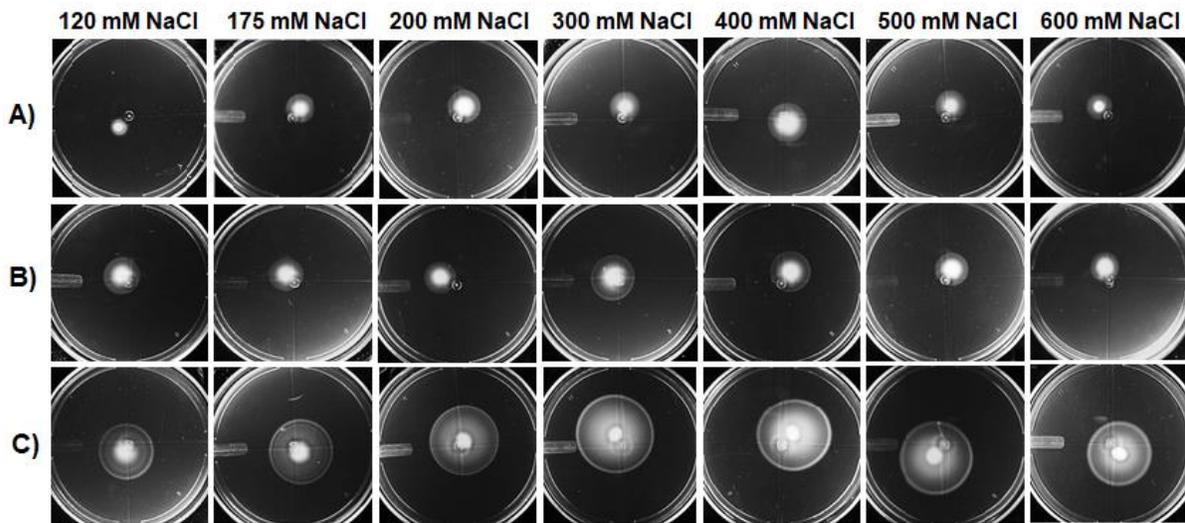
Se puede interpretar en el árbol filogenético que muestra eventos evolutivos de las especies del género *Vibrio* a partir de ancestros comunes. Los nodos internos representan eventos de divergencia o separación de un grupo en dos grupos, estos patrones de divergencia hacen referencia a los cambios que experimentan cada una de las especies por separado como consecuencia de mutaciones genéticas y selección natural. En la raíz del árbol filogenético se propone como antecesor de todas las especies de las vibrionáceas a *E. coli*.

Las especies *V. shilonii* y *V. harveyi* se muestran cercanos, al igual que *V. shilonii* y *V. alginolyticus*. Sin embargo, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* se encuentran cercanas de manera que ambas especies pertenecen al clado *Harveyi*.

En términos generales los resultados de secuenciación de la S16 ADNr coinciden con los resultados obtenidos del análisis de los alineamientos de secuencias de las proteínas PomA y PomB.

### **Ensayos de nado en medio semisólido**

Puesto que el flagelo de las bacterias del género *Vibrio* es impulsado mediante un gradiente de  $\text{Na}^+$  se evaluó la capacidad de nado de tres bacterias: *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, bajo siete diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 175 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM de NaCl), para ello se realizaron ensayos de nado en medio semisólido como se observa en la **Figura 32**.



**Figura 32.** Ensayos de nado en medio semisólido de tres bacterias del género *Vibrio* a diferentes concentraciones de NaCl. Columna A) Ensayos de motilidad en la bacteria *V. shilonii*. Columna B) Ensayos de motilidad en la bacteria *V. harveyi* y Columna C) Ensayos de motilidad en la bacteria *V. alginolyticus*.

En este experimento se observó que el halo formado por el desplazamiento de las bacterias depende del NaCl. Al comparar el nado de las tres vibronaceas se observa que los halos no tienen comportamientos similares.

En el **panel A** correspondiente a *V. shilonii*, se observa que no es capaz de nadar en la concentración de 120 mM de NaCl. Sin embargo cuando aumenta la salinidad en el medio se observan halos cada vez más grandes. En la concentración 400 mM de NaCl se muestra el crecimiento máximo del halo de modo que es el más grande de todas las concentraciones de NaCl. Por otro lado al seguir incrementando la concentración de NaCl se observa que el halo disminuye de tamaño. En la concentración 600 mM de NaCl se muestra un fenotipo de nado similar al de la concentración 120 mM de NaCl.

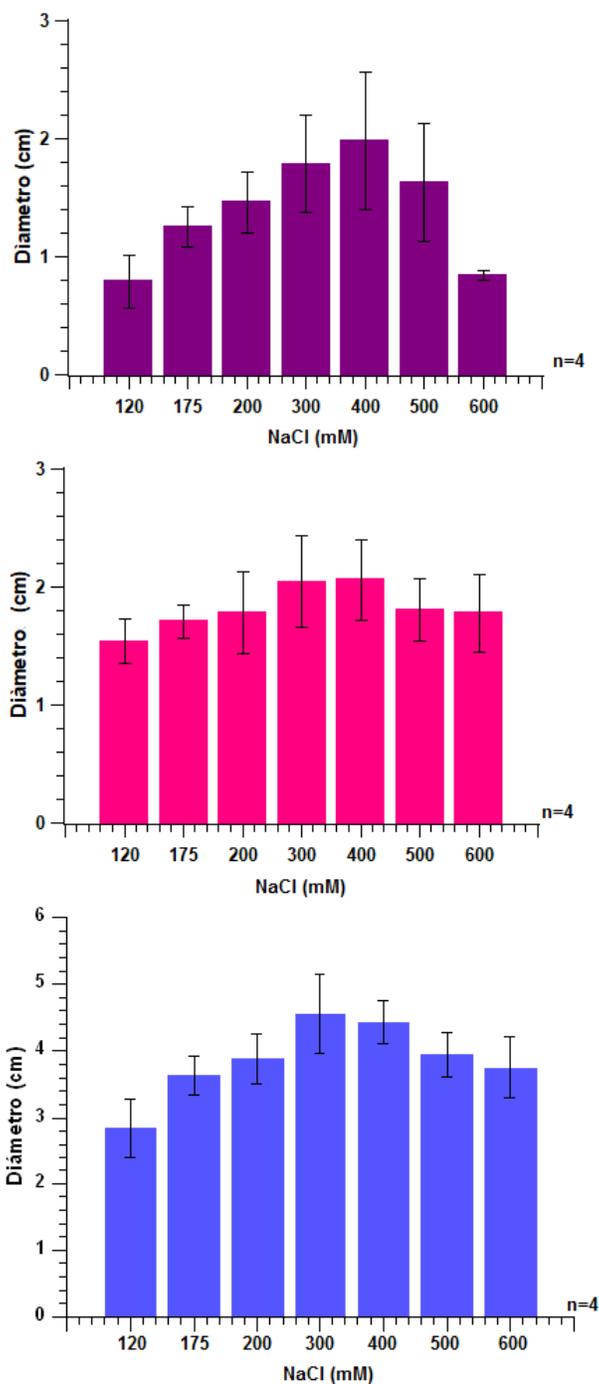
En el **panel B** se muestran los halos formados por el desplazamiento de *V. harveyi* en siete diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 175 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM). En la concentración 120 mM de NaCl se observa que la bacteria es capaz de nadar, produce un halo de menor diámetro en comparación con el resto de las concentraciones. Cuando la salinidad aumenta en el medio, los halos son cada vez más

grandes, no obstante en la concentración 300 mM de NaCl se produce el halo más grande en comparación con el resto de las concentraciones. A pesar de incrementar la salinidad en el medio se observa que el halo ha disminuido en la concentración 600 mM de NaCl.

El **panel C** representa los halos formados por el desplazamiento de *V. alginolyticus* bajo diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 175 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM). En la concentración 120 mM de NaCl se observa que las células son capaces de nadar y al incrementar la concentración de NaCl en el medio, el halo aumenta de tamaño, de manera que en la concentración 300 mM de NaCl el halo es más grande con respecto al resto de las concentraciones empleadas. En la concentración 300 mM de NaCl la bacteria alcanza su capacidad máxima de nado, mientras que en la concentración 600 mM de NaCl el tamaño del halo disminuye.

Con la finalidad de obtener información más precisa, se midieron los diámetros de los halos formados por el desplazamiento de las bacterias, mediante el programa ImageJ, se obtuvo el error estándar de las mediciones y los resultados se pueden observar en la **Figura 33**.

## Medición de diámetros formados por el desplazamiento de las bacterias: *Vibrio shilonii*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*



**Figura 33.** Diámetros de nado de las bacterias. Las barras de color morado representan a *V. shilonii*. En color rosa *V. harveyi* y en color azul *V. alginolyticus*. Estos ensayos fueron realizados 4 veces. Las mediciones se realizaron con el programa ImageJ. La barra representa el error estándar.

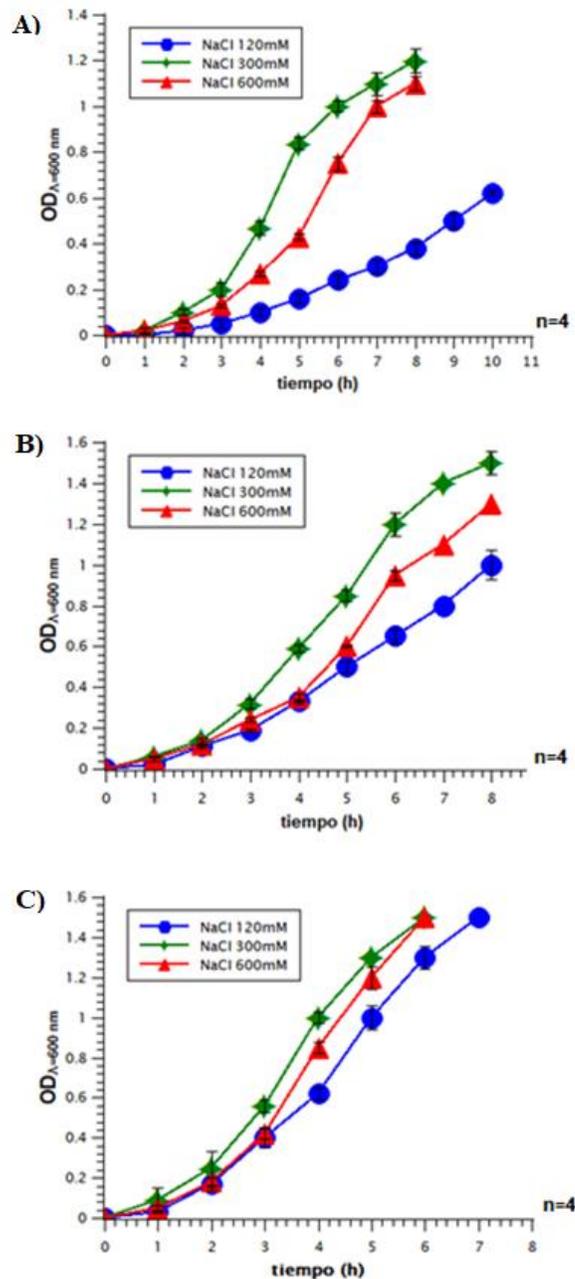
En **el panel A**, correspondiente a *V. shilonii*, se observa que existe un incremento del diámetro del 60.11% entre las concentraciones 120 y 400 mM de NaCl, mientras que el diámetro disminuye 57.58% entre las concentraciones 400 mM y 600 mM de NaCl, estos valores son estadísticamente significativos.

El **panel B** representado por *V. harveyi* se observa el incremento del diámetro de 25.73% entre las concentraciones 120 mM y 400 mM de NaCl, así mismo el diámetro disminuye un 13.60% entre las concentraciones 400 mM y 600 mM de NaCl. Los valores mostrados no son estadísticamente significativos.

Por último en **el panel C** correspondiente a *V. alginolyticus* se muestra un incremento del tamaño del diámetro de 35.90% en relación con las concentraciones 120 mM y 400 mM de NaCl. También es notorio observar que el diámetro disminuye 15.58% en relación con las concentraciones 120 mM y 400 mM de NaCl, estos valores no son significativos.

Una vez que se estableció el comportamiento de nado de las tres bacterias en las siete diferentes concentraciones de NaCl, se llevó a cabo curvas de crecimiento en medio de cultivo líquido TBSW utilizando las siguientes concentraciones de NaCl: 120 mM, 300 mM y 600 mM. Los resultados se muestran en la **Figura 34**.

## Curvas de crecimiento de las bacterias: *Vibrio shilonii*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*



**Figura 34.** Curvas de crecimiento de tres bacterias marinas del género *Vibrio* en tres concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM de NaCl). En **A**) se observa la curva de crecimiento de la bacteria *V. shilonii*. En **B**) se observa la curva de crecimiento de la bacteria *V. harveyi*. Finalmente en **C**) se observa la curva de crecimiento de la bacteria *V. alginolyticus*. Los ensayos se realizaron 4 veces, La barra representa el error estándar.

Las tres concentraciones de NaCl se seleccionaron debido a que *V. shilonii* es incapaz de nadar a altas concentraciones como 120 mM de NaCl, sin embargo difícilmente creció en esta condición.

Se sugirió trabajar con la concentración 300 mM de NaCl debido a que en un estudio con *V. alginolyticus* se ha observado que la tasa de rotación aumenta al incrementar la concentración de NaCl en el medio (Furuno *et al.*, 1997). La concentración de 600 mM de NaCl muestra semejanza fenotípica en los halos de nado con la concentración de 120 mM de NaCl.

Los ensayos de curva de crecimiento se replicaron cuatro veces. El comportamiento de las curvas de crecimiento es semejante en las tres bacterias: todas poseen tres fases de crecimiento (fase lag, fase logarítmica o exponencial y la transición a la fase estacionaria) que se relacionan con cambios metabólicos que sufren las células.

En el **panel A** se muestran tres curvas de crecimiento pertenecientes a *V. shilonii* en tres concentraciones de NaCl: 120 mM (en azul), 300 mM (en verde) y 600 mM (en rojo). En la concentración 120 mM de NaCl, se observa que *V. shilonii* demora en crecer en comparación con las concentraciones 300 mM y 600 mM de NaCl.

En la curva de crecimiento resultante de la concentración 120 mM de NaCl al transcurrir 1 hora, la fase lag termina y la fase exponencial inicia entre 1 a 10 horas en esta curva no se logró observar la transición a la fase estacionaria. En la concentración 300 mM de NaCl se observa la fase lag, después de transcurrir 1 hora inicia la fase exponencial culminando en la hora 6, mientras que entre las horas 6 y 8 horas se observa la transición a la transición a la fase estacionaria. En la curva de crecimiento con concentración 600 mM de NaCl se observa la fase lag entre las 0 y 1 hora, posteriormente entre la hora 1 a 6 se muestra la fase exponencial y entre las 6 a 8 horas inicia el cambio a la fase estacionaria (**Figura 34-A**).

Por otra parte en el **panel B** se encuentran tres curvas de crecimiento obtenidas de *V. harveyi* y son representadas como sigue: en azul corresponde a la concentración 120 mM de NaCl, en verde 300 mM de NaCl y en rojo 600 mM de NaCl. En la concentración 120 mM de NaCl las células crecen más lento con respecto con las concentraciones 300 mM y 600 mM de NaCl. La curva de crecimiento correspondiente a la concentración 120 mM de NaCl, se observa que al transcurrir 1 hora concluye la fase lag, sucesivamente las células se

preparan para la transición a la fase exponencial, la fase exponencial ocurre entre 1 a 8 horas. En esta curva de crecimiento no se logró observar la fase estacionaria.

Por otra parte la curva de crecimiento de 300 mM de NaCl muestra el inicio de la fase logarítmica a 1 hora de cultivar las células, mientras que la fase exponencial inicia entre las horas 1 a 6; la transición de la fase estacionaria es observada entre las horas 7 a 8. Para la curva de crecimiento realizada con concentración 600 mM de NaCl se observa la fase logarítmica a 1 hora de transcurrir el crecimiento de las células en el cultivo, mientras que la fase exponencial es observada entre las horas 1 a 6 y el cambio a la fase estacionaria ocurre entre 6 a 8 horas (**Figura 34-B**).

Finalmente en el **panel C** se muestran tres curvas de crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl: 120 mM, 300 mM y 600 mM realizados con *V. alginolyticus*. La concentración 120 mM de NaCl se observa la fase lag que abarca las horas 0 a 1 hora, seguido está la fase logarítmica abarcando de 1 a 6 horas de ser crecidas las células y el cambio a la fase estacionaria oscila entre 6 a 7 horas. En la curva de crecimiento con concentración de 300 mM de NaCl se observa que la fase lag culmina en la hora 1 dando inicio a la fase exponencial que comprende las horas 1 a 4 para dar lugar a la transición de la fase estacionaria que comprende 4 a 6 horas. En la concentración 600 mM de NaCl, la fase logarítmica se presenta de 0 a 1 hora de ser crecidas las células, mientras que la fase exponencial oscila entre las horas 1 a 4 y el cambio a la fase estacionaria se presenta a partir de 4 a 6 horas (**Figura 34-C**).

En estos experimentos se logró observar las fases de crecimiento de las bacterias y distintos comportamientos en tres diferentes concentraciones de NaCl. En la concentración 300 mM de NaCl las células crecen más rápido en menor tiempo en comparación con las concentraciones 120 mM y 600 mM de NaCl.

Con la finalidad de obtener las velocidades de nado de *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* en las concentraciones 120 mM, 300 mM, 600 mM de NaCl. Los cultivos fueron medidos a una  $O.D_{\lambda=600\text{ nm}}=0.6$  y se registró en video el nado de las células.

## **Velocidad de nado de las bacterias: *Vibrio shilonii*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus***

La **Tabla 5** muestra que en la concentración de 120 mM de NaCl afecta significativamente la velocidad de *V. shilonii*, de manera que no se obtuvieron resultados cuantificables debido a que son valores inferiores a lo establecido en la sección de Materiales y métodos. Sin embargo este resultado coincide con el ensayo de nado y las curvas de crecimiento, ya que las células de *V. shilonii* son incapaces de nadar en 120 mM de NaCl. Por otra parte *V. harveyi* se desplaza a mayor velocidad (48.94  $\mu\text{m/s}$ .) que *V. alginolyticus* (28.87  $\mu\text{m/s}$ ).

Para la concentración de 300 mM de NaCl, muestra incremento en la velocidad. *V. shilonii* (24.65  $\mu\text{m/s}$ ) al igual que *V. harveyi* (51.28  $\mu\text{m/s}$ ) y *V. alginolyticus* (35.65  $\mu\text{m/s}$ ). Interesantemente a la concentración 600 mM de NaCl. En *V. shilonii* se obtuvo una velocidad nula, como en la concentración 120 mM de NaCl. Este resultado coincide con el experimento del ensayo de nado. Para *V. harveyi* la velocidad disminuyó (44.29  $\mu\text{m/s}$ ) y notoriamente en *V. alginolyticus* continua el aumento de la velocidad (40.99  $\mu\text{m/s}$ ).

A grandes rasgos se puede intuir que estos cambios en la velocidad de nado se deben a que las bacterias tienen diferentes estilos de vida. La bacteria *V. shilonii* no nada en concentraciones altas y bajas de NaCl como: 120 mM y 600 mM de NaCl, mientras que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* que son más de vida libre y nadan a diversas concentraciones de NaCl como: 120 mM, 300 mM y 600 mM de NaCl.

Especie	OD 600 nm	Velocidad de nado ( $\mu\text{m/s}$ )		
		NaCl 120 mM	NaCl 300 mM	NaCl 600 mM
<i>V. shilonii</i> AK-1	0.6	-	24.65 $\pm$ 8.68	-
<i>V. harveyi</i> BB120	0.6	48.94 $\pm$ 5.59	51.28 $\pm$ 11.66	44.29 $\pm$ 7.71
<i>V. alginolyticus</i> VIO5	0.6	28.87 $\pm$ 7.39	35.65 $\pm$ 5.78	40.99 $\pm$ 7.84

**Tabla 5.** Velocidad de nado de las células de *V. shilonii* AK-1, *V. harveyi* BB120 y *V. alginolyticus* VIO5. Los valores de velocidad se obtuvieron analizando trayectorias, en video de 30 células por cada condición de crecimiento (120 mM, 300 mM y 600 mM de NaCl) y a un punto de densidad óptica (0.6). Para obtener el cálculo de las velocidades de nado de las células, se consideró las células que mostraron un desplazamiento superior a 11  $\mu\text{m}$ . Estos valores representan la velocidad de nado promedio  $\pm$  desviación estándar de cada muestra (n=30).

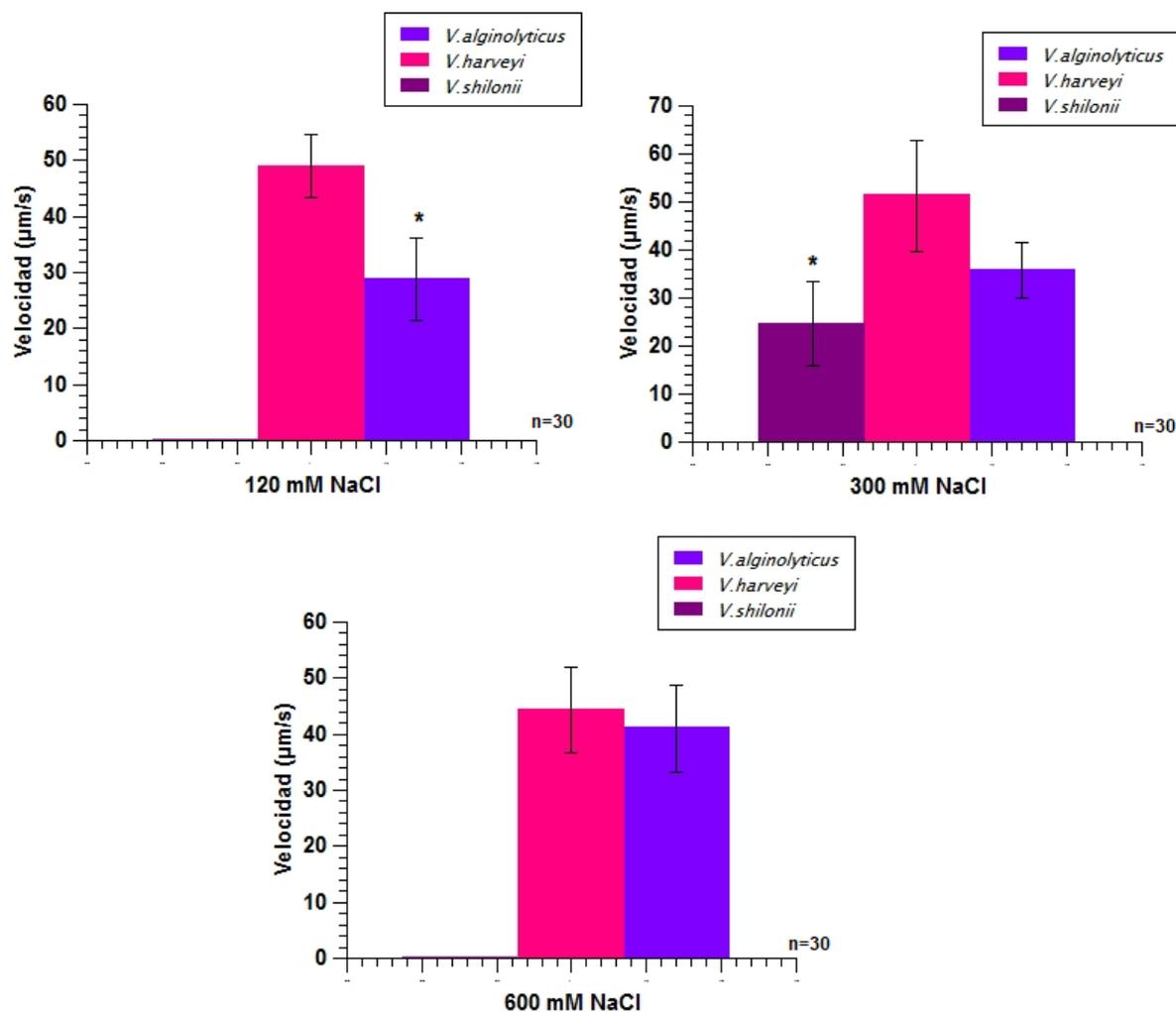
Con la finalidad de observar si existen diferencias significativas se realizó una prueba de varianzas (ANOVA) seguido de una prueba de T-student, en el promedio de 30 células del desplazamiento de las tres bacterias en tres diferentes concentraciones de NaCl: 120 mM, 300 mM y 600 mM. En este análisis se observó que en la concentración de 120 mM de NaCl, *V. shilonii* es incapaz de desplazarse, mientras que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* nadan, además existe diferencia significativa en la velocidad de nado de *V. alginolyticus* con respecto a *V. harveyi*.

En la concentración 300 mM de NaCl se observa que las tres bacterias son capaces de desplazarse a velocidades diferentes. Existen diferencias significativas en *V. shilonii* con respecto a *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.

Por último en 600 mM de NaCl *V. shilonii* no es capaz de nadar, mientras que *V. harveyi* además de poseer mayor velocidad que *V. alginolyticus* se encontró que no existen diferencias significativas entre estas dos especies de vibrios (**Figura 35**).

En este análisis se concluye que las bacterias de este estudio presentan diferentes comportamientos en la velocidad de nado bajo diferentes concentraciones de NaCl, esto

podría ser atribuido al estilo de vida, además de las concentraciones óptimas para su crecimiento.



**Figura 35.** Velocidad de tres bacterias marinas del género *Vibrio* (*V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*) a diferentes concentraciones de NaCl. Las velocidades se obtuvieron por un análisis de las trayectorias, en video de 30 células por cada concentración de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM de NaCl). El análisis de varianza (ANOVA) seguida con una prueba de T-student determinó que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los valores promedio de nado en estas bacterias.

## 8. DISCUSIÓN

### Los dos tipos de flagelos en el género *Vibrio*

Como se mencionó anteriormente la mayoría de las bacterias necesitan del flagelo para poder desplazarse. Las bacterias del género *Vibrio* requieren de dos tipos de flagelo para desplazarse (Atsumi *et al.*, 1992). Estos tipos de flagelos utilizan diferentes iones de acoplamiento para su rotación: iones  $\text{Na}^+$  para el flagelo polar en medios líquidos y  $\text{H}^+$  para el flagelo lateral en medios sólidos ó semisólidos (MacCarter, 2001). Existen vibrionaceas que expresan ambos tipos de flagelo (**Ver tabla 1**).

Las bacterias de interés en este trabajo: *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* presentan ambos tipos de flagelo. En un estudio demostraron que los flagelos laterales de *V. shilonii* pueden ser inducidos al aumentar la viscosidad del agar (González *et al.*, 2010). Por otra parte se ha observado que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* presentan ambos tipos de flagelo (MacCarter, 2001).

Se han sugerido varios escenarios para explicar cómo se ha originado el sistema dual del flagelo que posiblemente se originó a partir de eventos evolutivos. Una revisión publicada por Pallen and Matzke (2006), mencionan que la presencia del flagelo polar ó los flagelos laterales ó ambos tipos de flagelos en las bacterias, se debe a las presiones ambientales el cual podría ser un factor que promueve la diversificación y adaptación en los hábitats de diversos vibrios contribuyendo la activación de genes en el flagelo para poder coexistir.

Un trabajo publicado por Liu and Ochman (2007a) sugieren que el flagelo lateral de las bacterias *E. coli* y *S. enterica* pudo ser heredado por transferencia horizontal, así mismo, se ha realizado un análisis donde compararon operones flagelares en diferentes grupos bacterianos con sistemas flagelares duales. Se propone que los flagelos laterales en las vibrionaceas surgieron dos veces a partir de la duplicación del locus del flagelo polar. El sistema flagelar lateral presente en bacterias  $\beta$  y  $\gamma$ -proteobacterias parecen haberse originado a partir de una duplicación de todo el complejo del gen flagelar en el linaje  $\gamma$ -proteobacteriano no entérico y luego se transfirió de forma independiente al  $\beta$ -proteobacteriano y a las bacterias entéricas, de manera que esto podría explicar porque no

todas las especies de *Vibrio* tienen flagelos laterales, quizá este evento de duplicación haya sucedido varias veces en la historia de algunos Clados de la familia *Vibrionaceae* (Liu and Ochman, 2007b).

## **Alineamientos de secuencias de las proteínas transmembranales PomA y PomB**

Las proteínas de estator PomA y PomB forman el complejo PomA<sub>4</sub>PomB<sub>2</sub> que sirve como un canal de Na<sup>+</sup>. A nivel molecular las bacterias necesitan de estas proteínas transmembranales para poder desplazarse.

Los resultados mostrados de los alineamientos múltiples de secuencias de las proteínas PomA y PomB permitieron observar la relación evolutiva entre los clados y la relación que comparten los vibrios de interés en este trabajo.

Por otra parte, se encontró que las proteínas PomA son más conservadas entre sí que las proteínas PomB, se sugiere que esto es debido a que PomA posee cuatro hélices transmembranales y un segmento citoplasmático, mientras que PomB solo contiene dos hélices transmembranales de manera que los residuos que forman las hélices transmembranales son limitados a ciertos aminoácidos por su composición química y fisicoquímica, además algunos residuos son energéticamente más estables que otros. En un trabajo realizado por Eisenberg *et al* (1982) mencionan que las proteínas integrales de membrana son hidrofóbicas y están compuestas principalmente de  $\alpha$ -hélices. Los aminoácidos que forman las hélices transmembranales liberan diferentes cantidades de energía libre debido a que presentan un evento conocido como: momento hidrofóbico. El momento hidrofóbico mide la anfipaticidad de N aminoácidos en un segmento de una proteína ó péptido, indicando que una estructura es predominantemente hidrofóbica por un lado y predominantemente hidrofílica por el otro. Los segmentos de proteínas transmembranales tienen un segmento continuo de residuos que son particularmente hidrofóbicos, esto podría explicar porque PomA es más conservada que PomB.

En los alineamientos de secuencias de las proteínas PomA y PomB de las vibrionaceas, se señalaron las hélices transmembranales y los aminoácidos más

característicos como: Asp148, Asn194 y Leu183 (en PomA) y Phe22, Cys31 y Asp24 (en PomB) de modo que estos aminoácidos permiten al motor funcionar adecuadamente.

Existe evidencia donde se menciona que los residuos de aminoácidos de la proteína PomA (Asp148, Asn194, Leu183) y de PomB (Phe22 y Cys31) son importantes en el flagelo bacteriano de las vibrionáceas, ya que están involucrados en la translocación iónica y se ha sugerido que forman parte del canal iónico. También se ha demostrado que al sustituir el Phe22 por Tyr, Ser o Asn requiere altas concentraciones de Na<sup>+</sup> en el medio para hacer girar el motor (Onoue *et al.*, 2019).

Un estudio publicado por Li *et al.*, (2011a) se menciona que el Asp24 que se encuentra en la proteína PomB es el sitio de unión al Na<sup>+</sup> y juega un papel importante en el flagelo de los vibrios, ya que al realizar mutaciones puntuales (Asp24Asn y Asp24Cys) en la bacteria *V. alginolyticus*, se observó genotípicamente que inhibe su motilidad. También se ha observado en la proteína PomA que al realizar mutaciones puntuales en los aminoácidos Thr158Ala, Thr185Ala y Thr186Ala, *V. alginolyticus* no es motil. Con estas observaciones se intuye que las bacterias *V. shilonii* y *V. harveyi* probablemente son incapaces de desplazarse.

Existen otros aminoácidos que son importantes en la motilidad de vibrionáceas como el Asp148 (en PomA) y Pro16 (en PomB), de modo que se ha encontrado que al agregar un fármaco (fenamil) es capaz de bloquear el canal de Na<sup>+</sup> y como consecuencia provoca la inhibición del nado. (Morehouse *et al.*, 2011). Sin embargo, la afinidad de los diferentes motores por el fenamil es diferente en cada especie de vibrionáceas. En *V. alginolyticus* se ha observado que hasta 100 µM de fenamil el motor deja de rotar (Ishida *et al.*, 2019). Este evento se ha encontrado también en *V. shilonii* y se encontró que después de agregar 50 µM de fenamil, se reprime el funcionamiento del motor. La inhibición del nado en vibrios patógenos podría contribuir a las mejoras en las áreas de la medicina, economía y ecología, ya que la motilidad bacteriana está asociada a la virulencia (González *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente las proteínas PomA/PomB son homólogos a las proteínas MotA/MotB, por lo que se intuye que las vibrionáceas tienen regiones similares a *E. coli*, además es el modelo biológico más estudiado y su motor flagelar está compuesto por proteínas MotB.

En los alineamientos de secuencias de las proteínas PomB, se identificó la región periplásmica de “*linker*” (residuos 41 a 140) que contiene la región “*plug*” que sirve como un conector flexible y conecta el segmento transmembranal y la región PEM que contiene el dominio de unión a peptidoglicano (Li *et al.*, 2011b).

En las vibronaceas la región de “*linker*” se muestra altamente conservada, esta región es relevante para el crecimiento celular de *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolitycus*. Existe evidencia donde realizaron varias mutantes en la proteína MotB donde suprimieron algunos residuos de aminoácidos en la región “*linker*” en la bacteria *E. coli*, y con esas mutantes demostraron que causaba inhibición del crecimiento, pero no perjudicaba la motilidad del flagelo (Muramoto and Macnab., 1998). Se concluye con esto que las vibronaceas podrían inhibir su crecimiento como en el caso de *E. coli*.

En los alineamientos de PomB se observa la región “*plug*”, ésta posee residuos de aminoácidos conservados que abarca del aminoácido 44 a 58. Este “*plug*” tiene la función de regular el control de la entrada de iones Na<sup>+</sup> a través del complejo del estator, así como para el ensamblaje del mismo estator (Li *et al.*, 2011b). Se ha observado que al eliminar la región “*plug*”, no afecta la motilidad del flagelo, pero inhibe el crecimiento celular de las vibronaceas (Kojima *et al.*, 2009).

En los alineamientos de las proteínas PomB, en la región citoplasmática de la proteína se identificó una región conocida como PEM (*Periplasmic region Essential for Motility*) que abarca los aminoácidos 111 a 270. Un estudio publicado por Li *et al.*, (2011), encontraron que la proteína MotB de *E. coli* existe una estructura cristalina en la región del periplasma conocida como PEM. Se sugiere que la región PEM podría proporcionar información sobre los mecanismos moleculares de ensamblaje, anclaje y activación del estator del flagelo bacteriano. También encontraron que al hacer mutaciones en la región PEM existen efectos sobre la motilidad y el crecimiento celular.

Interesantemente dentro de la región PEM se encontró un segmento menos conservado, entre los aminoácidos 120 a 160. Posiblemente este sitio tiene una tasa de evolución diferente a otros sitios de la proteína ocasionando diferentes limitaciones funcionales y/o biofísicas (Echave *et al.*, 2016).

También se identificó en la proteína PomB el dominio de unión a peptidoglicano (residuos 231 a 239) se encuentra conservado en las vibronaceas. El motivo de unión a

peptidoglicano de PomB (MotB) se asocia con la capa de peptidoglicano para anclar el complejo PomA/PomB (MotA/MotB) alrededor del rotor. Diversas mutaciones en esta región de MotB en *E. coli* o *S. enterica* eliminan por completo la motilidad (Li *et al.*, 2011b).

Al comparar las secuencias de la región C-terminal de la proteína PomB, el dominio de unión a peptidoglicano, la región de las proteínas de tipo OmpA y entre los residuos 182 a 300 se encontró que *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* se muestran similares entre sí. Estas similitudes de las regiones entre bacterias probablemente se deben a que las regiones de las proteínas no evolucionaron mucho de modo que no se observaron demasiados cambios en sus aminoácidos.

Por otra parte es importante mencionar que la región periplásmica C-terminal de MotB de *E. coli* está involucrado con interacciones en la pared celular, al igual que en la proteína de la membrana externa como OmpA, este tipo de proteínas de la membrana externa interactúan con la capa de peptidoglicano de forma no covalente, cuando existe mutaciones sin sentido en esta proteína inactiva el funcionamiento de MotB Chun *et al.*, (1988). Posiblemente ocurra este evento en la proteína PomB de las vibrionaceas.

## **Árboles filogenéticos de las proteínas PomA/ PomB y matrices**

Se logró comparar cualitativamente las relaciones y similitudes que presentan las proteínas PomA y PomB entre catorce vibrios a través de árboles filogenéticos y así mismo se comparó cuantitativamente la identidad de estas bacterias a partir de la obtención de las matrices de los alineamientos múltiples de secuencias.

En los árboles filogenéticos de las proteínas PomA y PomB se observó que *V. shilonii* se encuentra alejada de *V. harveyi*, de modo que al comparar las proteínas PomA de ambas especies se encontró una identidad de similitud del 85.38%, mientras que en PomB el 80.70% de identidad.

Por otra parte las proteínas PomA y PomB de las especies *V. shilonii* y *V. alginolyticus* se muestran alejadas en ambos árboles filogenéticos (PomA 83.79% y en PomB 79.35%. de identidad).

Las proteínas PomA y PomB de *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, presentan una relación cercana, ambas especies pertenecen al clado *Harveyi* y comparten identidades similares (PomA=96.05%, PomB=95.86%).

Las proteínas PomA y PomB de las vibrionaceas de este estudio tienen alto porcentaje de similitud entre sí, por lo que se intuye que las proteínas no divergieron mucho entre sí, esto es debido a las presiones ambientales y la recombinación genética que existe entre las especies a lo largo del linaje de las vibrionaceas. En una revisión se ha observado que las proteínas tienen limitaciones estructurales y funcionales, se menciona que la flexibilidad y la divergencia evolutiva se han interpretado como evidencia de que la dinámica de las proteínas impone restricciones en la evolución de las secuencias. Un factor que es relevante es el desorden estructural de la proteína, los sitios de regiones desordenadas tienden a evolucionar más rápidamente con menos sustituciones de residuos de aminoácidos conservados, que las regiones ordenadas, así mismo algunos residuos podrían estar sujetos a restricciones funcionales, alteradas en varias porciones de la proteína provocando divergencia funcional evolutiva (Ito and Takahashi, 2016).

Las vibrinaceas podrían tener una función similar debido a los cambios de remplazo de los aminoácidos a lo largo de la historia evolutiva de estas bacterias. En un trabajo se ha estudiado que las secuencias homólogas tienen función similar y se sugiere que la importancia funcional de los sitios está inversamente relacionada con la tasa evolutiva de reemplazo de aminoácidos. Los sitios de mayor importancia funcional en la proteína se encuentran bajo restricciones selectivas más fuertes. Cuando la tasa evolutiva es homogénea las restricciones funcionales en los sitios son constantes en toda la historia evolutiva. Sin embargo, si la función de la proteína está cambiando, algunos residuos podrían estar sujetos a restricciones funcionales alteradas en varias porciones del árbol filogenético. Esto, a su vez, implica que las tasas de evolución podrían ser distintas en las diferentes ramas del árbol filogenético (Gaucher *et al.*, 2002).

Las tasas evolutivas varían entre los residuos dentro de una determinada proteína aunque parte de esta variación es atribuible a la selección diversificadora positiva, es decir, la presión de selección que desencadena la adaptación a cambios ambientales o de otro tipo, existe una heterogeneidad sustancial en la tasa incluso en sitios que no están sujetos a dicha presión de selección. Esta heterogeneidad probablemente surge de las diferentes

limitaciones funcionales y/o biofísicas que afectan a diferentes sitios de proteínas. Las tasas de evolución específicas de un sitio están influenciadas por una interacción dinámica entre las limitaciones estructurales y las limitaciones funcionales.

Otras limitaciones estructurales es la cinética de plegamiento, expresión de proteínas y el entorno celular. Los factores estructurales pueden limitar la evolución a nivel del sitio que incluyen la estructura secundaria, los enlaces de hidrógeno de la cadena lateral, los rotámeros de cadena lateral inusuales, los enlaces peptídicos no planos, las conformaciones de la cadena principal tensas y los residuos con carga hidrófila enterrados. (Echave *et al.*, 2016).

## Árbol filogenético de S16 ADNr

Las relaciones filogenéticas entre organismos permiten obtener datos importantes sobre la organización función y evolución de microorganismos y su ADN a lo largo de toda la escala filogenética. Para realizar árboles filogenéticos uno de los genes que comúnmente se utilizan es el 16S ADNr, que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal (16S ARNr) el cual es un gen muy conservado en la escala evolutiva y parece que reproduce correctamente la relación entre organismos (Olsen y Woese, 1993).

Los resultados evidencian que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* tienen una relación evolutiva estrechamente cercana, pero se distinguen claramente por diversas características fenotípicas y genotípicas. Posiblemente esta relación estrecha es debido a que ambas especies pertenecen al clado *Harveyi* y poseen una agrupación similar en sus características bioquímicas y fisiológicas reportadas en el Genbank. En contraste con la evolución fenotípica, la variedad genotípica cambia continuamente, produciendo abundantes cambios (Olsen y Woese, 1993).

La bacteria *V. shilonii* ha sido relacionada por la similitud del gen 16S con *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, y se encontró que *V. shilonii* se encuentra alejada de estas últimas dos bacterias. Probablemente esto es debido a que *V. shilonii* ha estado sometida a presiones selectivas distintas en comparación con *V. harveyi* y *V. alginolyticus*. A lo largo de las escalas de tiempo evolutivo y la competencia por la sobrevivencia puede hacer que las especies adapten estilos de vida alternativos, para unirse a diferentes hospedadores o

diferentes sustratos. Existe evidencia donde se menciona que los vibrios representan un componente importante de los microbiomas cultivables de los huéspedes marinos y el plancton. Su proliferación y abundancia de población puede ser inducida por múltiples factores, incluido el aumento de la temperatura del agua relacionada con el cambio climático global, que puede causar impactos en la estructura del ecosistema, incluidas las enfermedades asociadas a *Vibrio*. Sin embargo, cuando no se favorece la proliferación de vibriones, estos son capaces de refugiarse en reservorios adecuados para sobrevivir, haciendo uso de sus amplias capacidades adaptativas. Los vibrios pueden cambiar de células que nadan libremente a "células enjambre" que prosperan en entornos más viscosos como biopelículas, o cambiar de una etapa activa a una etapa inactiva y viable pero no cultivable, sin embargo aún pueden ser oportunistas si se repiten las condiciones favorables (Chimetto *et al.*, 2015).

Un trabajo publicado por Arbeláez-Cortés *et al.*, (2015) menciona que la interacción del escenario geográfico, el tiempo y los efectos de las diferentes fuerzas evolutivas que conlleva a que las bacterias posean molecularmente propiedades similares, además de la formación de nuevos linajes a partir de preexistentes a través de un proceso denominado especiación.

Una revisión publicada por Thompson *et al.*, (2014) menciona un análisis comparativo del genoma el cual, ha revelado una variedad de eventos genómicos, que incluyen mutaciones, reordenamientos cromosómicos, pérdida de genes por desintegración o deleción y adquisiciones de genes por duplicación o transferencia horizontal. Todos estos eventos pueden ser fuerzas impulsoras de la evolución y especiación de los vibrios. La transferencia horizontal de genes parece ser un mecanismo eficaz para introducir nuevos fenotipos en el genoma de estas bacterias. El impacto de la transferencia horizontal de genes en la evolución de los vibrios es evidente y puede explicar varios genotipos únicos.

La divergencia de los vibrios ha ocasionado la diversidad de especies influenciadas por gradientes medioambientales como: la temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y factores biológicos como: depredación y relaciones simbióticas para poder coexistir en diferentes nichos ecológicos (Leyton *et al.*, 2008).

Interesantemente se encontró que *V. shilonii* y *V. mediterranei* son idénticos entre sí. En un trabajo se encontró que *V. shilonii* es un sinónimo de *V. mediterranei* (Kushmaro *et al.*

2001). Sin embargo, Rosenberg *et al.*, (2004) observó que *V. shilonii* y *V. mediterranei* son especies distintas ya que muestran diferencias en sus composiciones de ácidos grasos, tolerancias de sal y capacidad para utilizar sacáridos. Posiblemente esto se deba a que ambas bacterias fueron encontradas en espacios geográficos cercanos de modo que el ambiente marino probablemente era similar, ocasionando que estas bacterias tengan una relación cercana.

## **Ensayos de nado en agar blando**

Antes del presente trabajo únicamente se habían estudiado dos concentraciones de NaCl (120 mM y 345 mM) en la bacteria *V. shilonii*. Los ensayos de nado en agar blando mostraron que *V. shilonii* es capaz de nadar en ambas concentraciones de NaCl (González *et al.*, 2010).

En el presente estudio se logró estandarizar el comportamiento del nado de tres vibriónaceas: *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* bajo siete diferentes concentraciones de NaCl (120 mM, 175 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM).

Los ensayos de nado han permitido comenzar a describir el comportamiento en estas vibriónaceas. Al evaluar el fenotipo del nado en *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, se observó un tipo de movimiento conocido como: “*swimming*” el cual las bacterias son capaces de nadar con su único flagelo polar en medios líquidos. Los experimentos de este trabajo fueron realizados con una concentración de agar al 0.25%. Estudios muestran que cuando las concentraciones de agar en el medio son superiores a 0.30% se excluye la motilidad de tipo “*swimming*” cambiando al nado enjambado ó “*swarming*” (Kearns, 2010).

En los resultados se encontró que *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* se comportan de diferente manera bajo siete distintas concentraciones de NaCl de modo que, se observaron diferentes fenotipos. Las diferencias de estos fenotipos posiblemente se deben a que los vibrios son dinámicos en el medio acuático y se pueden encontrar asociados con huéspedes animales o vegetales. La gama de relaciones ecológicas incluye asociaciones patógenas y mutualistas (Amaral *et al.*, 2014).

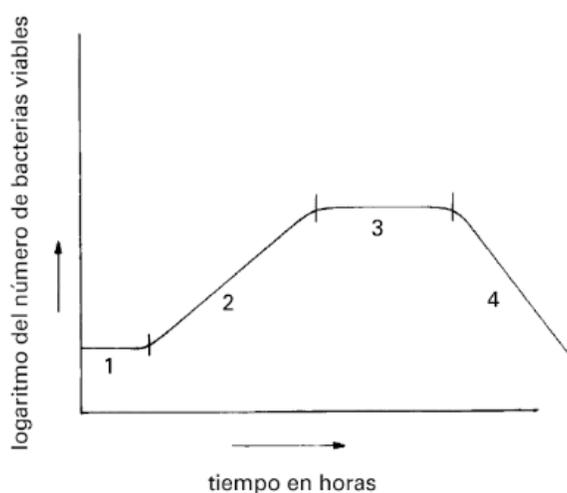
El flagelo bacteriano es capaz de censar distintas concentraciones salinas a través de la quimiotaxis, el cual está mediado por una cascada de transducción de señales que permiten nadar a las bacterias hacia condiciones favorables (atrayentes), o alejarse de ambientes tóxicos (repelentes) (Briegel *et al.*, 2016).

Interesantemente *V. shilonii* censa las diferentes concentraciones de NaCl y una consecuencia es la inhibición del nado. Al comparar el nado de las concentraciones 120 mM y 600 mM de NaCl se encontraron fenotipos similares, sin embargo, la concentración idónea para nadar es de 400 mM de NaCl. También se encontró que existen diferencias significativas en los diámetros formados por el desplazamiento de las células, entre las concentraciones 120 mM y 400 mM de NaCl del mismo modo esto sucede al comparar las concentraciones 400 mM y 600 mM de NaCl. Por otro lado *V. harveyi* y *V. alginolyticus* nadan sin problemas en las concentraciones 120 mM, y 600 mM de NaCl y la concentración adecuada para nadar de ambas especies es 400 mM de NaCl. En los diámetros formados por el desplazamiento de las bacterias no se encontraron diferencias significativas, no obstante, estos diferentes comportamientos en el nado probablemente está relacionado con el metabolismo celular microbiano y además a que las proteínas Poma y Pombo poseen distintos aminoácidos en sus secuencias genéticas los cuales pueden influir funcionalmente en la adaptación y respuesta al estrés ocasionado por el NaCl, incluso el estilo de vida de las bacterias es un factor importante, ya que estas dependen principalmente de la motilidad, de ahí la importancia de comprender cómo el flagelo responde a los cambios en el medio ambiente (González *et al.*, 2015).

La motilidad proporciona una ventaja de supervivencia en una amplia variedad de entornos, lo que permite que las bacterias compitan con éxito por los nutrientes. Por tanto, los microorganismos han desarrollado una multiplicidad de sistemas de motilidad que les permiten desplazarse en medios líquidos o viscosos y sobre superficies (González *et al.*, 2010).

## Curvas de crecimiento de las bacterias: *Vibrio shilonii*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*.

Típicamente la curva de crecimiento presenta cuatro fases: **i)** fase de latencia o lag, **ii)** fase exponencial o de crecimiento, **iii)** fase estacionaria y **iv)** fase de muerte (**Figura 36**) (Granados y Villaverde, 2003). Es notorio observar que en algunos casos se logró identificar el inicio de la fase estacionaria pero en los experimentos no se logró identificar la fase de muerte, probablemente porque aún no se agotan los nutrientes en el medio (Brock *et. al.*, 2003) o porque las bacterias tienen mecanismos que les permiten cambiar su expresión génica favoreciendo la síntesis de los productos de ciertos genes y reprimiendo la síntesis de otros (González *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando inicia la fase de muerte se observa el agotamiento de reservas de energía y la imposibilidad de llevar a cabo las reacciones básicas para el mantenimiento de la célula, esta fase representa una disminución progresiva en el número de células viables para obtener metabolitos secundarios de la fase estacionaria.



**Figura 36.** Esquema de curva de crecimiento bacteriano. Se muestran las cuatro fases de crecimiento: **1)** fase de latencia en la que no hay aumento de la población, las células sufren cambios en su composición química y aumentan de tamaño, aumento de sustancias intracelulares. **2)** fase logarítmica ó exponencial las células se duplican al mismo ritmo y las actividades metabólicas constantes y condiciones de crecimiento es equilibrado. **3)** fase estacionaria, se van agotando los nutrientes y acumulando productos tóxicos en la que algunas células mueren y otras siguen creciendo. **4)** fase de muerte o lisis las células mueren en cuestión de horas o días dependiendo del microorganismo. (Imagen tomada de Granados y Villaverde, 2003).

Por otra parte se encontró en *V. shilonii* que la concentración 120 mM de NaCl tiene un efecto en el crecimiento, mientras que en altas concentraciones como 300 mM y 600 mM de NaCl no se observa un efecto. En *V. harveyi* se mostró un efecto similar metabólicamente en las tres concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM). También se encontró que el crecimiento de *V. alginolyticus* tiene un efecto similar en las tres concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM). Sin embargo, *V. alginolyticus* es más halófila en comparación con *V. shilonii* y *V. harveyi*. Es importante resaltar que en las curvas de crecimiento de las tres bacterias estudiadas se encontró que la concentración de 300 mM de NaCl muestra un crecimiento acelerado con respecto a las concentraciones 120 mM y 600 mM de NaCl, esto es debido a que los microorganismos han desarrollado respuestas moleculares rápidas bajo un estímulo (González-Hernandez *et al.*, 2002). Los diferentes comportamientos están integrados al metabolismo celular de cada especie bacteriana bajo las diferentes concentraciones de NaCl. Posiblemente esto se debe a que las bacterias regulan coordinadamente cambios o modificaciones del NaCl a partir de su envoltura celular, lo que les permiten crecer y sobrevivir en distintos ambientes, esto les proporcionan a las bacterias ventajas para adaptarse dentro de su huésped, facilitando así la capacidad de colonizar y localizarse en determinados tejidos. El metabolismo bacteriano se centra en la diversidad química de las oxidaciones del sustrato y las reacciones de disimilación (reacciones mediante las cuales se descomponen las moléculas del sustrato), que normalmente funcionan en las bacterias para generar energía. También dentro del alcance del metabolismo bacteriano está el estudio de la captación y utilización de los compuestos inorgánicos u orgánicos necesarios para el crecimiento y mantenimiento de un estado estable celular (reacciones de asimilación) (Ali, Md., 2013).

Interesantemente *V. shilonii* crece más lento en comparación con *V. harveyi* y *V. alginolyticus* en la concentración 120 mM de NaCl, esto es debido a que la concentración 120 mM de NaCl no es suficiente para un óptimo crecimiento en *V. shilonii*, mientras que para *V. harveyi* y *V. alginolyticus* es idóneo para crecer. El hábitat natural de *V. shilonii* varía entre 633 mM a 684 mM de NaCl (Skiridis *et al.*, 2018), mientras que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* oscila entre 513 mM y 684 mM de NaCl. Probablemente estas bacterias necesitan de una relación simbiótica para poder crecer en condiciones óptimas y obtener los

nutrientes necesarios para sobrevivir, ya que en los resultados se encontró que las bacterias crecen en menor tiempo en la concentración 300 mM y 600 mM de NaCl en comparación con la concentración 120 mM de NaCl. Una revisión publicado por Khan *et al.*, (2020) menciona que algunas especies de vibrio pueden formar asociaciones simbióticas con organismos acuáticos y con los seres humanos que es caracterizado por el movimiento flagelar. La motilidad flagelar en especies patógenas de vibrio se considera un enfoque prometedor para controlar las infecciones por vibrio.

### **Análisis de velocidad de nado en las bacterias: *Vibrio shilonii*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus***

Con los resultados obtenidos en la **tabla 4**, se logró describir el comportamiento de la velocidad de nado de *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* en tres concentraciones de NaCl: 120 mM, 300 mM y 600 mM.

Un trabajo publicado por Kita-Tsukamoto *et. al.*, (2004) sugiere que el aumento de velocidad del nado se debe al incremento en la concentración de iones sodio. Esto solo se cumple para *V. alginolyticus* de manera que se encontró que la velocidad del nado aumenta al incrementar el NaCl: 120 mM de NaCl ( $28.87 \pm 7.39$ ), 300 mM de NaCl ( $35.65 \pm 5.78$ ), y 600 mM de NaCl ( $40.99 \pm 7.84$ ). El valor obtenido en la concentración 300 mM de NaCl es muy cercano al que reporta Magariyama *et al.*, 2001, obtuvieron un valor de  $37.30 \pm 12.50$ .

Por otro lado para *V. harveyi* y *V. shilonii* no cumple lo anteriormente mencionado. En *V. harveyi* se encontró que la concentración 120 mM de NaCl la bacteria nada  $48.94 \pm 5.59$ , en 300 mM de NaCl  $51.28 \pm 11.66$  y en 600 mM de NaCl  $44.29 \pm 7.71$ . En *V. shilonii* se encontró que en la concentración 300 mM de NaCl muestran una velocidad de nado de  $24.65 \pm 8.00$ , mientras que no se observó la velocidad en las concentraciones 120 mM y 600 mM de NaCl. Posiblemente estas diferencias de las velocidades de nado son debido a que las tres bacterias tienen diferentes estilos de vida entre sí, por lo que reaccionan de diferente manera a distintos ambientes marinos. Las bacterias se encuentran en una amplia

gama de entornos bióticos y abióticos dinámicos y para prosperar en entornos cambiantes y diferentes, las bacterias deben adaptarse (Sun et al., 2018).

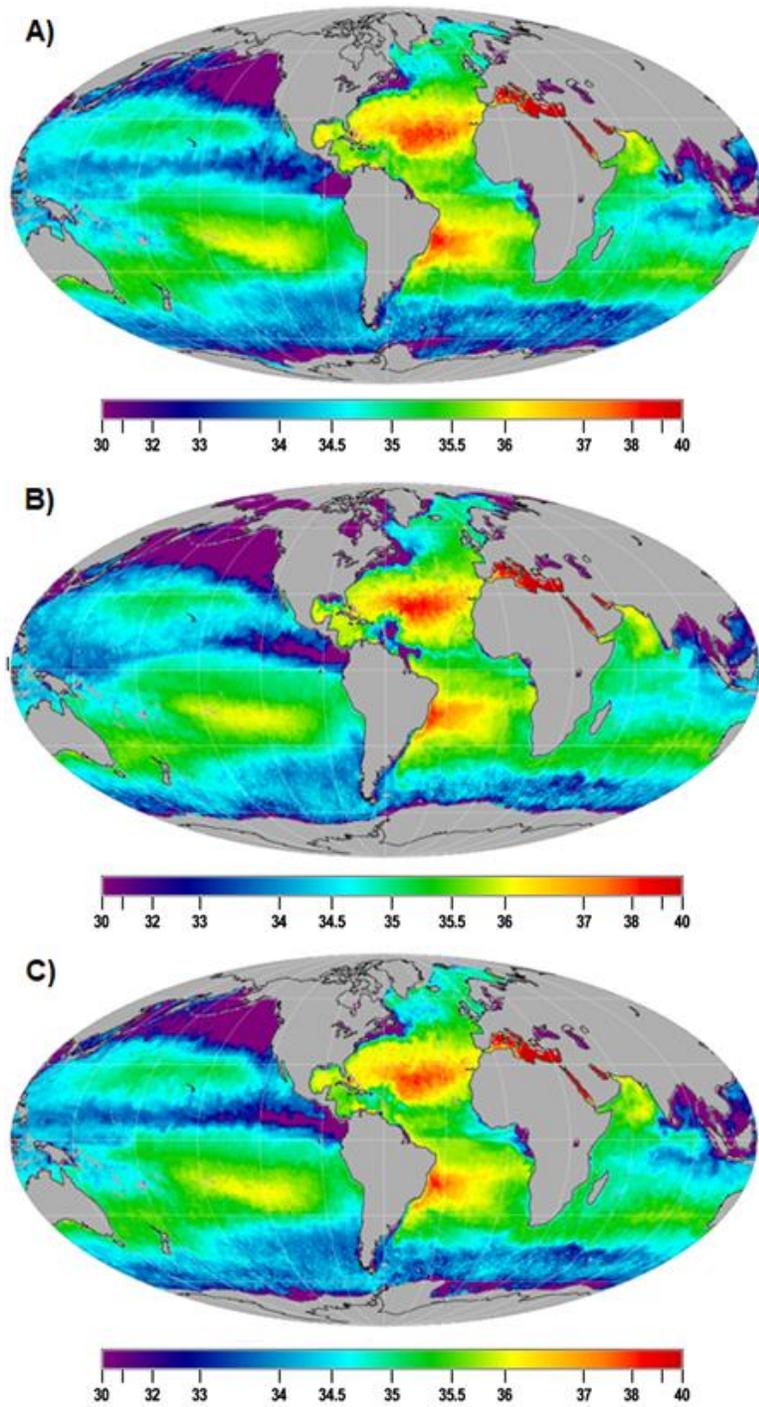
Sin embargo, en un trabajo publicado por González *et al.*, 2015 se realizó un experimento en el cual determinaron el crecimiento de *V. shilonii* en medio líquido TBSW que contenía 120 mM de NaCl a una  $OD_{\lambda=600\text{nm}}=0.25$ , y reportaron que las células de *V. shilonii* muestran una velocidad de nado de  $47.1 \pm 2.5$  m / s. Cabe mencionar que este resultado no coincide con lo obtenido de manera que, el factor influyente es el crecimiento microbiano ya que en este estudio se experimentó con  $OD_{\lambda=600\text{nm}}=0.6$ . Posiblemente esto es debido a que en ésta densidad celular empieza a disminuir los nutrientes del medio de cultivo.

La concentración 120 mM de NaCl no favorece el crecimiento de *V. shilonii*. La disminución de la síntesis de ADN y proteínas no es sincrónica, de manera que el metabolismo de las células de las bacterias se reorganiza de manera que acumulan compuestos de reserva y osmoprotección y aumenta la degradación de macromoléculas (Ramírez *et al.*, 2005).

Las gráficas que representan la velocidad del nado contribuyeron a analizar de manera visual que existen diferentes comportamientos en las velocidades de nado en cada concentración utilizada. Se encontró que existe diferencias significativas en *V. shilonii* al comparar en la concentración 300 mM de NaCl pero al comparar en la concentración 600 mM de NaCl no existen diferencias significativas en las velocidades obtenidas. Se sugiere que las bacterias se comportan de manera diferente debido a que cada especie posee distintos estilos de vida, entre otros factores. Un artículo publicado por Takemura *et al.*, (2014) mencionan que muchas especies vibronaceas crecen en el agua del océano, ya sea en forma de vida libre o asociadas con varios tipos de partículas orgánicas, aunque la asociación con animales puede ser una parte importante del ciclo de vida de muchas especies de vibrios, hay otros que sólo se asocian con los animales y humanos. Para comprender mejor en qué condiciones se producen y proliferan los vibrios, la mayoría de los estudios han investigado las variables ambientales que se pueden medir a partir del agua de mar, como la temperatura, salinidad, el oxígeno disuelto, el nitrógeno, el fósforo, estos son parámetros que se pueden medir fácilmente y muchos se pueden observar de forma remota o por Satélite.

En la **Figura 37** se muestran tres mapas obtenidos a partir del satélite *Aquarius* de la NASA ([https://aquarius.oceansciences.org/cgi/gal\\_salinity.htm](https://aquarius.oceansciences.org/cgi/gal_salinity.htm)) donde se muestra una escala de salinidad de los mares y océanos que oscila de 30 ppt a 40 ppt (*Parts Per Thousand*) equivalente a 513 mM y 684 mM de NaCl respectivamente. El **mapa A** corresponde al mes de enero, se observó que el mar Mediterráneo presenta baja salinidad de manera que la temperatura es cercana a 15°C. En el **mapa B** muestra que en agosto, el mar Mediterráneo contiene alta salinidad y se ha observado que la temperatura incrementa a 30°C, mientras que en el mes de diciembre (**mapa C**) la salinidad del mar Mediterráneo es baja y la temperatura oscila entre 15°C a 20 °C (Rosenberg and Falkovitz., 2004). Los hábitats de las especies de vibrios son diversos ya que dependen de la temperatura, la altitud de los mares y el flujo marino. Una revisión menciona que la alta salinidad del mar Mediterráneo se debe a que es una cuenca semi-cerrada y evaporativa, es decir, la evaporación excede en gran medida la precipitación y la escorrentía de los ríos (Skiris *et al.*, 2018).

El hábitat de las vibrionaceas se encuentra en una amplia gama de temperaturas y salinidades. La temperatura es un determinante significativo en la formación de asociaciones ecológicas de vibrios con innumerables organismos hospedantes. Las bacterias *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* están expuestas a diferentes ambientes halófilos. Sin embargo, es poco el conocimiento que se tiene sobre la distribución, abundancia, supervivencia y función ecológica.



**Figura 37.** Mapas de distribución salina. En **A)** se observa la salinidad en el mes de enero. En **B)** se muestra en el mes de agosto y en **C)** representa el mes de diciembre. La gama de colores de azul a morado reflejan las áreas con menor salinidad mientras que las de mayor están de rojo a amarillo, la escala de salinidad va de 33 a 40 ppt. Los mapas se obtuvieron del registro del satélite *Aquarius* de la NASA.

Se logró observar diferentes comportamientos de velocidad bajo tres concentraciones de NaCl utilizadas en este estudio.

En condiciones de laboratorio se encontró que *V. shilonii* difícilmente crece en la concentración 120 mM de NaCl pero no nada en ésta concentración. Sin embargo, se ha visto que *V. shilonii* habita en el mar Mediterráneo el cual, tiene una concentración salina que oscila entre 37 ppt a 40 ppt (633 mM a 684 mM de NaCl). Por otro lado, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* crecen y nadan en la concentración 120 mM de NaCl, estas bacterias se distribuyen mundialmente y su hábitat varía entre 30ppt a 40 ppt (513 mM a 684 mM de NaCl). Posiblemente estas diferencias de comportamientos se deben a que la motilidad del flagelo de las vibronaceas depende de la concentración del NaCl y del estilo de vida (González *et al.*, 2015).

La bacteria *V. shilonii* tiene una relación simbiótica con el coral *O. patagonica* y con *H. carunculata* (gusano de fuego), probablemente *V. shilonii* no es tanto de vida libre en comparación con *V. harveyi* y *V. alginolyticus* que pueden tener relaciones simbióticas con diversidad de organismos marinos. *V. shilonii* podría obtener la concentración idónea para crecer y nadar a partir de esta relación simbiótica y nadar dentro del coral para desplazarse dentro del mismo. Existe evidencia donde se menciona que la incapacidad de *V. shilonii* para blanquear al coral *O. patagonica* en invierno podría deberse a una mayor resistencia del coral o una disminución de la virulencia del patógeno y la disminución de la temperatura por lo que *V. shilonii* se aísla en su reservorio *H. carunculata* que le proporciona a la bacteria la temperatura y nutrientes necesarios para sobrevivir de manera que este organismo se alimenta de corales (Martín and Lozada, 1991).

Los trabajos publicados sobre la motilidad del flagelo de la familia *Vibrionaceae* y los resultados mostrados en este trabajo brindan un estudio más amplio sobre la descripción de estas especies y la relación con el NaCl a diversas concentraciones. El flagelo de *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, comparten una historia evolutiva, sin embargo sigue siendo aún poco entendida.

## 9. CONCLUSIONES

- El alineamiento de secuencias múltiples de las proteínas PomA y PomB permitió encontrar similitudes entre las secuencias de las tres bacterias de estudio y conocer los residuos de aminoácidos más importantes y la importancia que estos tienen en el flagelo bacteriano.
- A partir de las matrices proporcionadas por los alineamientos de las proteínas PomA y PomB, se logró observar cuantitativamente la relación porcentual de similitud entre *V. shilonii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*. Las proteínas PomA/PomB de *V. shilonii* en comparación con las proteínas de *V. harveyi* y *V. alginolyticus* son similares entre sí. *V. harveyi* y *V. alginolyticus* tienen mayor porcentaje de similitud en comparación con *V. shilonii*.
- Los árboles filogenéticos de las proteínas PomA/PomB empleados en este trabajo mostraron gráficamente las relaciones entre las especies del género *Vibrio*, de modo que se logró observar que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* son más cercanos con respecto a *V. shilonii*, de manera que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* pertenecen al clado *Harveyi*, mientras que *V. shilonii* está clasificado en el clado *Mediterranei*.
- El árbol filogenético de las secuencias S16 muestra que *V. shilonii* se encuentra alejada con respecto a *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, sin embargo estas últimas dos especies tienen una relación muy estrecha por lo que se intuye que las bacterias sufrieron eventos evolutivos como la divergencia que causó que algunas de las vibrionáceas originaran dos sistemas de flagelación (polar y lateral) para coexistir en distintos nichos ecológicos y poder tener la capacidad de relacionarse simbióticamente con varios organismos.
- El desplazamiento de las bacterias en el medio semisólido forman diferentes fenotipos en siete concentraciones de NaCl (120 mM, 175 mM, 200 mM, 300 mM,

400 mM, 500 mM y 600 mM). La concentración idónea de NaCl para hacer crecer y nadar a las bacterias del género *Vibrio* oscila entre 300 mM y 400 mM de NaCl.

- Se logró observar en las gráficas de las mediciones de los diámetros que *V. shilonii* presenta porcentualmente un incremento en el diámetro, de modo que muestran diferencias significativas entre las concentraciones 120 mM y 400 mM de NaCl, así mismo sucede al comparar entre las concentraciones 400 mM y 600 mM de NaCl, mientras que en *V. harveyi* y *V. alginolyticus* no existen diferencias significativas bajo las mismas condiciones en las que se comparó a *V. shilonii*.
- La concentración de NaCl juega un papel muy importante en el crecimiento bacteriano de los vibrios. Las curvas de crecimiento mostraron algunas fases de crecimiento y también diferentes comportamientos en tres concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM de NaCl).
- La velocidad de nado de las vibrionáceas depende de la concentración del NaCl y del estilo de vida de cada especie. Se logró observar diferentes comportamientos en la velocidad de nado. *V. shilonii* no nada en las concentraciones 120 mM y 600 mM de NaCl, mientras que *V. harveyi* y *V. alginolyticus* nadan en las tres concentraciones de NaCl (120 mM, 300 mM y 600 mM).

## 10. PERSPECTIVAS

- A partir de los experimentos mostrados en este trabajo se sugiere realizar dos mutantes utilizando el gen *poma* de *V. shilonii* AK-1 de manera que la primera mutante pueda complementarse con el alelo de *poma* de *V. harveyi* BB120 y la segunda mutante usando el gen *poma* de *V. shilonii* complemente con el alelo de *poma* de *V. alginolyticus* VIO5. Estas mutantes permitirían asignarle una relevancia genotípica al comportamiento de motilidad de las bacterias del género *Vibrio*.
- Realizar la construcción dos mutantes utilizando el gen *pomb* de *V. shilonii* AK-1 de manera que la primera mutante pueda complementarse con el alelo de *pomb* de *V. harveyi* BB120 y la segunda mutante usando el gen *pomb* de *V. shilonii* complemente con el alelo de *pomb* de *V. alginolyticus* VIO5. Estas mutantes permitirían asignarle una relevancia genotípica al comportamiento de motilidad de las bacterias del género *Vibrio*. De acuerdo con lo reportado la proteína PomB es menos conservada que la proteína PomA por lo que es importante observar si existen cambios significativos al comparar las mutantes que contienen el gen *pomb* con las mutantes que tienen el gen de *poma*.
- Estandarizar las concentraciones de NaCl y analizar el fenotipo de estas mutantes mediante ensayos de nado en agar blando 0.25% y medir los diámetros generados por el desplazamiento de las bacterias con el programa imageJ, con la finalidad de observar diferentes comportamientos y diferencias significativas. Se intuye que al tener estas mutantes que complementen con *V. harveyi* y *V. alginolyticus* los diámetros generados por el desplazamiento de las células sean más pequeños, en comparación con los resultados reportados en éste trabajo.
- Los resultados muestran que el crecimiento bacteriano depende de la concentración del NaCl, es recomendable realizar curvas de crecimiento bajo las tres condiciones de NaCl utilizada en este estudio. Estos ensayos arrojarían resultados interesantes probablemente las fases de crecimiento de las mutantes sean menos prolongadas en

la concentración 120 mM de NaCl en comparación con las concentraciones de 300 mM y 600 mM de NaCl.

- Los ensayos de velocidad de nado dependen de la concentración del NaCl. Es necesario medir la velocidad de nado de las mutantes. Probablemente el comportamiento de las mutantes de *V. harveyi* y *V. alginolyticus* sometidas en el medio de cultivo con la concentración 120 mM de NaCl se observaría motilidad ya que en los resultados de este trabajo la motilidad de *V. shilonii* fue nula en dicha concentración. Se intuye que en las concentraciones 300 mM y 600 mM de NaCl la velocidad de las mutantes sea menor en comparación a lo mostrado en el presente trabajo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aizawa, S., I. (1996). Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* **19**(1):1-5.
- Aldridge, P., Karlinsey, J. E., Becker, E., Chevance, F. F. V., Hughes, K. T. (2006). Flk prevents premature secretion of the anti- $\sigma$  factor FlgM into the periplasm. *Mol Microbiol.* **60**(3): 630–642.
- Ali, Md. (2013). Bacterial Metabolism. 10.13140/RG.2.1.5159.5363.
- Amaral GRS, Dias GM, Wellington-Oguri M, Chimetto L, Campeão ME, Thompson FL, Thompson CC (2014) Genotype to phenotype: identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**:357–365.
- Ananthakrishnan, R., Ehrlicher, A. (2007) *Int J Biol Sci.* **3**(5):303-317.
- Arbeláez-Cortés, E., Sánchez-González, L., A., Valencia A., S., Navarro-Sigüenza, A., G. (2015). Modelos de especiación. *UNAM* .6-25 pp.
- Armitage, J.P., Macnab, R.M. (1987) Unidirectional intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* **169**: 514-518.
- Asai, Y., Kojima, S., Kato, H., Nishioka, N., Kawagishi, I., Homma, M. (1997). Putative channel component for the Fast-Rotating Sodium-Driven Flagellar Motor of a Marine Bacterium. *J Bacteriol.* **179**(16): 5104-5110.
- Atsumi, T., Y. Maekawa, H., Tokuda., Imae, Y. (1992). Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature.* **355**:(6356):182-184.
- Austin B., Zhang X., H. (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol.* **43**(2):119-124.
- Baker, M., D., Wolanin, P., M., Stock, J., B. (2006). Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays.* **28**(1):9-22.
- Balebona, M. C., Andreu, M., J., Bordas, A. (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured GiltHead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ. Microbiol.* **64** (11): 4269-4275.

- Banin, E., T., Israely, M., Fine, Y. Loya., Rosenberg, E. (2001a). Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. *FEMS Microbiol Lett.* **199** (1): 33-7.
- Banin, E., Khare, S.K., Nader, F., Rosenberg, E. (2001b) Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of Zooxanthellae. *Appl Environ Microbiol.* **67**(4):1536-1541.
- Belas, R., M. Simon., Silverman, M. (1986). Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol.* **167**(1):210-8.
- Blake, P. A. 1994. *Historical perspectives on pandemic cholera*, p. 293–296. In I. K. Wachsmuth, P. A. Blake, and O. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Böttcher, T., Elliott, H., L., Clardy, J. (2016). Dynamics of Snake-like Swarming Behavior of *Vibrio alginolyticus*. *Biophys J.* **110**(4): 981–992.
- Boyd, E., F., Carpenter, M., R., Chowdhury, N., Cohen, A., L., Haines-Menges, B., L., Kalburge, S., S., Kingston, J., J., Lubin, J., B., Ongagna-Yhombi, S., Y., Whitaker W., B. (2015). Post genomic analysis of the evolutionary history and innovations of the family *Vibrionaceae*. *Microbiol Spectr.* **3**(5):10.
- Braun, T., F., Al-Mawsawi, Kojima, S., Blair, D., F. (2004). Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **43**(1):35-45.
- Briegel, A., Ortega, R., D., Mann, P., Kjaer, A., Riggaard, S., Jensen, J., G. (2016). Chemotaxis cluster 1 proteins form cytoplasmic arrays in *Vibrio cholera* and are stabilized by a double signaling domain receptor DosM. *PNAS.* **113**(37):10412–10417.
- Brock, Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003). *Biología de los Microorganismos*. Ed. 10. Ed. Pearson. 1096 pag.
- Chevance, F., F., Hughes, K., T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol.* **6**(6):455-65.

- Chilcott, G., S., Hughes, K., T. (2000). Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4):694-708.
- Chimetto Tonon, L. A., Silva, B. S., Moreira, A. P., Valle, C., Alves, N., Jr, Cavalcanti, G., Garcia, G., Lopes, R. M., Francini-Filho, R. B., de Moura, R. L., Thompson, C. C., & Thompson, F. L. (2015). Diversity and ecological structure of vibrios in benthic and pelagic habitats along a latitudinal gradient in the Southwest Atlantic Ocean. *PeerJ*, **3**, e741.
- Chun, S. Y., Parkinson, J., S. 1988. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**:276–278.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredini, E., Toti, L. (2001). Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett Appl Microbiol.* **32** (1):57-61.
- Dailey, F., E., Berg, H., C. (1993). Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *PNAS.* **90**(3):1043–1047.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., (2008). Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J.* **2**:19–26.
- DePamphilis, M., L., Adler, J. (1971). Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol.* **105**(1): 396-407.
- Dueñas Ramírez, P., Campos N., Quirós-Rodríguez, J. (2012). Los crustáceos decápodos del Departamento de Córdoba, Colombia. Biodiversidad de la fauna de crustáceos decápodos en el Caribe colombiano. Ed. Académica española.
- Dyer , C., M., Vartanian, A., S. Zhou, H., Dahlquist, F., W. (2009). A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching. *J Mol Biol.* **388**(1):71-84.
- Echave J, Spielman S., J., Wilke C., O. (2016) Causes of evolutionary rate variation among protein sites. *Nat Rev Genet.* **17**(2):109-21.
- Echazarreta M. A., Klose E. K. (2019) *Vibrio* Flagellar Synthesis. *Front Cell Infect. Microbiol.* **9**:131.

- Eisenberg, D., Wesson, M. and Wilcox, W. (1982). Hydrophobic Moments as Tools for Analyzing Protein Sequences and Structures. In: Fasman G.D. (eds) Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation. Springer, Boston, MA.
- Erhardt, M., Namba, K., Hughes, T., K. (2010). Bacterial Nanomachines: The Flagellum and Type III Injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**(11):a000299.
- Erhardt, M., Singer, H., M., Wee, D., H., Keener, J., P., Hughes, K., T. (2011). An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in *Salmonella enterica*. *EMBO J.* **30**(14): 2948-61.
- Evans, L. D., Hughes C., Fraser, G. M., (2014). Building a flagellum outside the bacterial cell. *Trends Microbiol.* **22**(10):566-572.
- Fujii, T., Kato, T., Namba, K. (2009). Specific Arrangement of  $\alpha$ -Helical Coiled Coils in the Core Domain of the Bacterial Flagellar Hook for the Universal Joint Function. *Structure.* **17**(11):1485-93.
- Fujii, T., Kato, T., Hiraoka, K., D., Miyata, T., Minamino, T., Chevance, F., F., V., Hughes, K., T., Namba, N. (2017). Identical folds used for distinct mechanical functions of the bacterial flagellar rod and hook. *Nat. Commun.* **8**:14276.
- Fukumura, T., Makino, F., Diertsche, T., Kinoshita, M., Kato, T., Wagner, S., Namba, K., Imada, K., Minamino, T. (2017). Assembly and stoichiometry of the core structure of the bacterial flagellar type III export gate complex. *PLOS Biology* **15**(8): e2002281.
- Furuno, M., Atsumi, T., Yamada, T., Kojima, S., Nishioka, N., Kawagishi, I., Homma, M. (1997). Characterization of polar-flagellar-length mutants in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology.* **143**(5):1615-1621.
- Gaucher EA, Gu X, Miyamoto MM, Benner SA. Predicting functional divergence in protein evolution by site-specific rate shifts. 2002. *Trends Biochem Sci.* **27**(6):315-21.
- González-Hernández, J. C., Peña, A. (2002). Estrategia de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbio.* **44** (3-4): 137-156.

- González, Y., Venegas, D., Mendoza-Hernandez, G., Camarena, L., Dreyfus, G. (2010). Na<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>-dependent motility in the coral pathogen *Vibrio shilonii*. *FEMS Microbiol Lett.* **312**:142–15.
- González, Y., Dreyfus, G. (2015). Motilidad de las bacterias marinas del género *Vibrio*. *Rev Educ Bioquímica.* **34**(4): 98-108.
- Gomez, J. M., Fajardo, R., Patiño, J. F., Arias, A. C. (2003). Necrotizing Fasciitis Due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent Patient. *J Clin Microbiol* **41**(7):3427-3429.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Swings, J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Bachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**(1):239-243.
- Granados, P. R., Villaverde, P., M., C. (2003). *Microbiología*. Ed.Thomson Paraninfo. España, Madrid. 324 pp.
- Guttenplan, S. B., Shaw, S., Kearns, D.B. (2012). The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **87**(1):211-29.
- Hazelbauer, L., G., Falke., J., J., Parkinson, J., S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci.* **33**(1):9-19.
- Homma, M., Iino, T. (1985). Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **162**(1):183-189.
- Ikeda, T., Homma, M., Lino, T., Asakura, S., Kamiya, R. (1987). Localization and stoichiometry of hook-associated proteins whithing *Salmonella typhimurium* flagella. *J Bacteriol.* **169**(3): 1168-73.
- Ishida, T., Ito, R., Clark, J., Matzke, N., J., Sowa, Y., Baker, M., A., B. (2019). Sodium-powered stators of the bacterial flagellar motor can generate torque in the presence of phenamil with mutations near the peptidoglycan-binding region. *Mol Microbiol.* **111**(6):1689-1699.
- Ito, M., Takahashi, Y. (2017). Nonconventional cation-coupled flagellar motors derived from the alkaliphilic *Bacillus* and *Paenibacillus* species. *Extremophiles* **21**: 3–14.
- Jarrell, K. F., McBride, M. J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol.* **6**(6):466-76.

- Johnson, F. H., Shunk, I. V. (1936). An interesting new species of luminous bacteria. *J Bacteriol.* **31**(6):585–592.
- Joshep, S., W., Colwell, R. R., Kaper, J., B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and halophilic Vibrios. *Crit Rev Microbiol.* **10**(1): 77-124.
- Jurica, M. S., Stoddard, B., L. (1998). Mind your B's and R's: bacterial chemotaxis, signal transduction and protein recognition. *Structure* **6**(7): 809-13.
- Kearns, D., B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol.* **8**(9):634– 644.
- Kita-Tsukamoto, K., Wada, M., Yao, K., Noshino, T., Kogure, K. (2004). Flagellar motors of marine bacteria Halomonas are driven b both protons and sodium ions. *Can J Microbiol.* **50**(5):369-374.
- Kitao, A. Hata, H. (2018). Molecular dynamics simulation of bacterial flagella. *Biophys Rev.* **10**(2):617-629.
- Kojima, S. Yamamoto, K., Kawagishi, I., Homma, M. (1999). The Polar Flagellar Motor of *Vibrio cholerae* Is Driven by an Na<sup>+</sup> Motive Force. *J Bacteriol.* **181**(6):1927-30.
- Kojima, S., Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., Homma, M., Namba, K. (2009). Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB. *Mol Microbiol.* **73**(4): 710–8.
- Krell, T., Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darias, J., A., Cadirci, B., H., García-Fontana, C., Ramos, J., L. (2011). Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ. Microbiol.* **13**(5): 1115-24.
- Kumar, A., Isumi, M., Sakuma, M., Zhu, S., Nishino, Y., Onoue, Y., Kojima, S., Miyanoiri, Y., Imada, K., Homma, M. (2017). Biochemical characterization of the flagellar stator-associated inner membrane protein FliL from *Vibrio alginolyticus*. *J Biochem.* **161**(4):331–337.
- Kurochkina, N., Guha, U. (2013). SH3 domains: modules of protein-protein interactions. *Biophys Rev.* **5**(1):29-39.
- Kushmaro, A., Loya, Y., Fine, M., Rosenberg, E. (1996). Bacterial infection and coral bleaching. *Nature.* **380**:396.

- Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., Rosenberg, E. (2001). *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagónica*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**(4):1383-1388.
- Leyton, Y., Riquelme, C. (2008). *Vibrios* en los sistemas marinos costeros. *Rev biol. mar. Oceanogr.* **43**(3):441-456.
- Li, N., Kojima, S., Homma, M. Sodium-driven motor of the polar flagellum in marine bacteria *Vibrio*. (2011). *Genes Cells.* **6**(10):985-99.
- Li, N., Kojima, S., Homma, M. (2011). Characterization of the Periplasmic Region o PomB, a Na<sup>+</sup>-Driven Flagellar Stator Protein in *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol.* **193**(15):3773-84.
- Liu, R., Ochman, H. (2007a). Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems. *J Bacteriol.* **189**(19):7098-104.
- Liu, R., Ochman, H. (2007b). Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *PNAS.* **104**(17):7116-21.
- MAG. Manual Básico de Salinidad Piscícola. (2011) FAO Paraguay. 51 pp.
- Maldonado, K., A., Mohiuddin, S., S. Biochemistry, Hypertonicity. (2019) May 6. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 31082139.
- McCarter, L., L. (1998). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **1**(1): 51-57.
- McCarter, L., L. (2001) Polar Flagellar Motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65**(3):445-62.
- Macnab, R. M. 1976. Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *J Clin Microbiol* **4**(3):258-65.
- Magariyama, Y., S. Masuda, Y. Takano, T. Ohtani., Kudo, S. (2001). Difference between forward and backward swimming speeds of the single polar-flagellated bacterium. *Vibrio alginolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett* **205**(2): 343-347.
- Maki-Yonekura, S., Yonekura, S. y Namba, K. (2010). Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament. *Nat Struc Mol Biol.* **17**(4): 417-22.

- Manefield, M., Harris, L. Rice, S., A. de Nys, R., Kjelleberg, S. (2000). Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(5):2079-2084.
- Matsunami, H., Barker, C., Yoon, Y. (2016). Complete structure of the bacterial flagellar hook reveals extensive set of stabilizing interactions. *Nat Commun* **7**:13425.
- Mei Y, Liu H, Zhang S, Yang M, Hu C, Zhang J. (2017) Effects of salinity on the cellular physiological responses of *Natrinema* sp. J7-2. *PLoS ONE*: **12**(9):e0184974.
- Minamino, T., Morimoto, Y., V., Hara, N., Namba, K. (2011). An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nat Commun* **2**:475.
- Minamino, T. (2014). Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochim Biophys Acta* **1843**:1642-8.
- Minamino, T., Imada, K. (2015). The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends in Microbiol.* **30**(10):1-8.
- Morehouse, K., A., Hogley, L., Capeness, M., Sockett, E. (2011). Three motAB Statr Gene Products in *Bdellovibrio bacteriovorus* Contribute to Motility of a Single Flagellum during Predatory and Prey-Independent Growth. *J. Bacteriol.* **193**(4):932-943.
- Morimoto, V., Y., Nakamura, S., Kaml-Ike., N., Namba, K., Minamino, T. (2010). Charged residues in the cytoplasmic loop of MotA are required for stator assembly into the bacterial flagellar motor. *Mol Microbiol.* **78**(5):1117-29.
- Morimoto, Y. V., Minamino, T. (2014). Structure and function of the Bi-directional Bacterial Flagellar Motor. *Biomolecules.* **4**(1):217-234.
- Munn, C., B. (2015). The role of vibrios in diseases of corals. *Microbiol Spectr.* **3**(4).
- Muramoto, K., Macnab, R., M. (1998). Deletion analysis of MotA and MotB, components of the force-generating unit in the flagellar motor of *Salmonella*. *Mol Microbiol.* **29**(5):1191-202.

- Nackerdien, Z. E., Keynan, A., Bassler, L. B., Lederberg, J., Thaler, S. D. (2008). Quorum Sensing Influences *Vibrio harveyi*. Growth Rates in a Manner Not Fully Accounted For by the Marker Effect of Bioluminescence. *PLOS ONE* **3**(2): e1671.
- Nealson, K., H., Wimpee, B., Wimpe., C. (1993). Identification of *Vibrio splendidus* as a Member of the Planktonic Luminous Bacteria from the Persian Gulf and Kuwait Region with luxA Probes. *Appl Env Microbiol.* **59**(8):2684-2689.
- Olsen, G., J., Woese, C., R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* **7**(1):113-23.
- Onoue, Y., Iwaki, M., Shinobu, A. Nishihara Y. Iwatsuki H. Terashima, H. Kitao, A. Kandori, H., Homma M. (2019). Essential ion binding residues for Na<sup>+</sup> flow in stator complex of the *Vibrio* flagellar motor. *Sci Rep.* **9**(1):11216.
- O'Shea, T. M., Deloney-Marino, C. R., Shibata, S., Aizawa, S., Wolfe, A. J., Visick, K. L. (2005). Magnesium promotes flagellation of *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol.* **187**: 2058–65.
- Owens, L., Busico-Salcedo, N. (2006). *Vibrio harveyi*: Pretty problems in Paradise, in Thompson F L., Austin B and Swings J (eds). *The biology of Vibrios*. Whashington DC: ASM Press, 266-280.
- Pallen, M., J. Matzke, N., J. (2006). From *The Origin of Species* to the origin of bacterial flagella. *Nat Rev Microbiol.* **4**(10):784-90.
- Parkinson, J., S. (2003). Bacterial Chemotaxis: a New Player in Response Regulator Dephosphorylation. *J Bacteriol.* **185**(5):1492-4.
- Pierce, B., A. (2012) *Genética un enfoque conceptual*. Ed. Medica Panamericana, (Ed. 3a). España, Madrid. 806 pp.
- Prayitno, S. B., Latchford, J., W. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*– effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture.* **132**:105–112.
- Prouty, M. G., Correa, N. E., Klose, K. E. (2001) The novel sigma54- and sigma28-dependent fagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* **39**(6):1595–609.
- Pujalte, M., J., Garay, E. (1986). Proposal of *Vibrio mediterranei* sp. nov.: A New Marine Member of the Genus *Vibrio*. *Int J Syst Bacteriol.* **36**(2):278-281.

- Ramírez, S., J., Contreras F., G., Gómez E., M., C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev Latinoam Microbiol* **47** (3-4): 92-101.
- Ravikumar, V., Vijayakumar, R. (2017). *Vibrio alginolyticus* emerging food born pathogen. *AJST*. **8**(6)4887-4891.
- Reid, S. W., Leake, M. C., Chandler, J. H., Lo, C. J., Armitage, J. P., Berry, R. M. (2006). The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *PNAS*. **103**: 8066-8071.
- Reilly, G., D., Reilly, C., A, Smith, E., G., Baker-Austin, C. (2011). *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Euro Surveill*. **16**(42):19994.
- Ringgard, S., Yang, W., Alvarado, A., Schirner, K., Briegel, A. (2018). Chemotaxis arrays in *Vibrio* species and their intracellular positioning by the ParC/ParP system. *J Bacteriol* 200:e00793-17.
- Rosenberg, E., Falkovitz, L. (2004) The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol*. **58**:143-159.
- R. C. Edgar (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res* **32**(5):1792- 1797.
- Sabir, M., Ennaji, M. M., Bouchrif, B., Cohen, N. (2013). *Vibrio Alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. *IJST*. **2**(4): 302-309.
- Schuhmacher, J. S., Thormann, K. M., Bange, G. (2015). How bacteria maintain location and number of flagella?. *FEMS Microbiol Rev*. **39**(6):812–22.
- Saijo-Hamano, Y., Matsunami, H., Namba, K. and Imada K. (2019) Architecture of the Bacterial Flagellar Distal Rod and Hook of *Salmonella*. *Biomolecules*. **9**(7): 260.
- Samatey, F. A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T. R., Thomas, D. R., Chen, J. Z., DeRosier, J. D., Kitao, A. & Namba, K. (2004). Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*. **431**(7012):1062- 8.
- Simms, S., A., Keane, M., G., Stock, J. (1985). Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem*. **260**(18):10161-10168.
- Soutourina, O., Bertin, P., N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. **27**(4):505-23.

- Sawabe, T., Kita- Tsukamoto, K., Thompson, F. L. (2007). Inferring the evolutionary History of vibrios by means of Multilocus sequence analysis. *J Bacteriol.* **189**(21): 7932–7936.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, K. W. Eliceiri: 2012, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* **9**(7):671-675.
- Shikongo-Nambabi, M. N. N. N., Petrus, N. P. Schneider, M. B. (2012). The role, isolation and identification of *Vibrio* species on the quality and safety of seafood. *Biotech Mol Biol Rev.* **7**(2):16-30.
- Skliris, N., Zika, J.D., Herold, L. (2018). Mediterranean sea water budget long-term trend inferred from salinity observations. *Clim Dyn* **51**:2857–2876
- Stock, D., Namba, K. Lee, L. K: (2012). Nanorotors and self- assembling macromolecular machines: the torque ring of the bacterial flagellar motor. *Curr Opin Biotechnol.* **23**(4):545-54.
- Sun, E., Liu, S., Hancock, R., E., W. Surfing Motility: a Conserved yet Diverse Adaptation among Motile Bacteria. 2018. *J Bacteriol.* **200**(23):e00394-18.
- Takekawa, N., Kojima, S., Homma, M. (2014). Contribution of Many Charged Residues at the Stator-Rotor Interface of the Na<sup>+</sup>-Driven Flagellar Motor to Torque Generation in *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol.* **196**(7):1377-85.
- Takekawa, N., Kojima, S., Homma M. (2016). Mutational analysis and overproduction effects of MotX, an essential component for motor function of Na<sup>+</sup>-driven polar flagella of *Vibrio*. *J Biochem.* **161**(2):159-166.
- Takemura, F., A., Chien, D., M., Polz, M., F. (2014). Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population. *Front. Microbiol.* **5**:38.
- Terahara N, Sano M, Ito M. (2012). A *Bacillus* Flagellar Motor That Can Use Both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> as a Coupling Ion Is Converted by a Single Mutation to Use Only Na<sup>+</sup>. *PLOS ONE* **7**(9): e46248.
- Terashima, H., Kojima, S. Homma, M. (2008) Flagellar motility in bacteria: structure and function of flagella motor. *Int Rev Cell Mol Biol.* **270**:39-85.
- Terashima, H. Imada, K. (2018). Novel insight an energy transduction mechanism of the bacterial flagellar type III protein export. *Biophys Physicobiol.* **15**:173-178.

- Tercero-Albuero, J., J., González-Márquez, H., Bonilla-González, E., Quiñones-Ramírez, E., Vázquez-Salinas, C. (2014). Identification of capsule, biofilm, lateral flagellum, and type IV pili in *Vibrio mimicus* strains. *Microb Pathog.* **76**:77-83.
- Thormann, K., M., Paulik, A. (2010). Tuning the flagellar motor. *Microbiology* **156**(5): 1275-1283.
- Thompson, F. L., B. Hoste, C. C. Thompson, G. Huys, Swings J. (2001). The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro et al. 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986. *Syst Appl Microbiol.* **24**(4):516–9.
- Thompson, F. L., B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, K. Engelbeen, R. Denys. Swings, J. (2002). *Vibrio trachuri* Iwamoto et al. 1996 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(3):973-976.
- Thompson, L., F., Lida, T. Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**(3):403-31.
- Thompson, F. L., Gevers, D. C. C., Thompson, P., Dawyndt, S., Naser, B., Hoste, C., Munn, B. Swings, J. (2005a). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Env Microbiol.* **71**(9):5107–5115.
- Thompson, F. L., Thompson, C. C., Naser, S., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Munn, C., Bourne, D., Swings, J. (2005b). *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**(3):973-976.
- Tsang, J., Hoover, T., R. (2014). Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:681754.
- Ueno, T. Oosawa, K. Aizawa, S. (1992). M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J Mol Biol.* **227**(3):672-7.
- Vonderviszt, F., Imada, K., Furukawa, Y., Uedaira, H., Namba, K. (1998). Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2. *J Mol Biol.* **284**(5):1399-416.

- Vonderviszt F, Namba K. Structure, Function and Assembly of Flagellar Axial Proteins. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
- Wadhams, G. H. Armitage, J. P. (2004) Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**:1024–1037.
- Walther-Mendoza, M., Reyes-Bonilla, H., LaJeunesse, T., C. y López- Pérez, A. (2016). Distribución y diversidad de dinoflagelados simbióticos en corales pétreos de la costa de Oaxaca, Pacífico de México. *Rev Mex Biod.* **87**(2):417-426.
- Williams, A., W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S., I., Kawagishi, I., Macnab, R., M. (1996). Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **178**(10):2960-70.
- Wilson, B., Aeby, G., S., Work, T., M. Bourne, D., G. (2012). Bacterial communities associated with healthy and *Acropora* white syndrome-affected corals from American Samoa. *FEMS Microbiol Ecol.* **80**(2):509–520.
- Wollenberg, M., S. Ruby, E., G. (2012). Phylogeny and fitness of *Vibrio fischeri* from the light organs of *Euprymna scolopes* in two Oahu, Hawaii populations. *ISME J.* **6**(2): 352–362.
- Yang Y, Yeh, Lp., Cao, Y. et al. (1983). Characterization of marine luminous bacteria isolated off the Coast of China and description of *Vibrio orientalis* sp. nov. *Curr Microbiol.* **8**:95-100.
- Yang, Q., Defoirdt, T. (2014). Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environ Microbiol.* **17**(4):960-8.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature.* **424**: 643-650.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura., S., Homma, H. (2011) Structure of the Flagellar Motor Protein Complex PomAB: Implications for the Torque-Generating Conformation. *J Bacteriol* **193**(15): 3863-70.
- Yorimitsu, T., Kojima, M., Yakushi, T. Homa, M. (2004). Mutimeric structure of the PomA/PomB channel complex in the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J Biochem.* **135**(1):43-51.

- Zhang, X. H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Mar Life Sci Technol.* **2**: 231–245.
- Zhao, X., Norris, S., J. Liu, J. (2014). Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry* **53**(27):4323-33.
- Zhu, S., Kojima, S. Homma, M. (2013). Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*. *Front Microbiol.* **4**:410.
- Zhu, S., Nishikinoc, T., Hua, B., Kojimac, S., Hommac, M., Liua, J. (2017). Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *PNAS.* **114**(41):10966-10971.