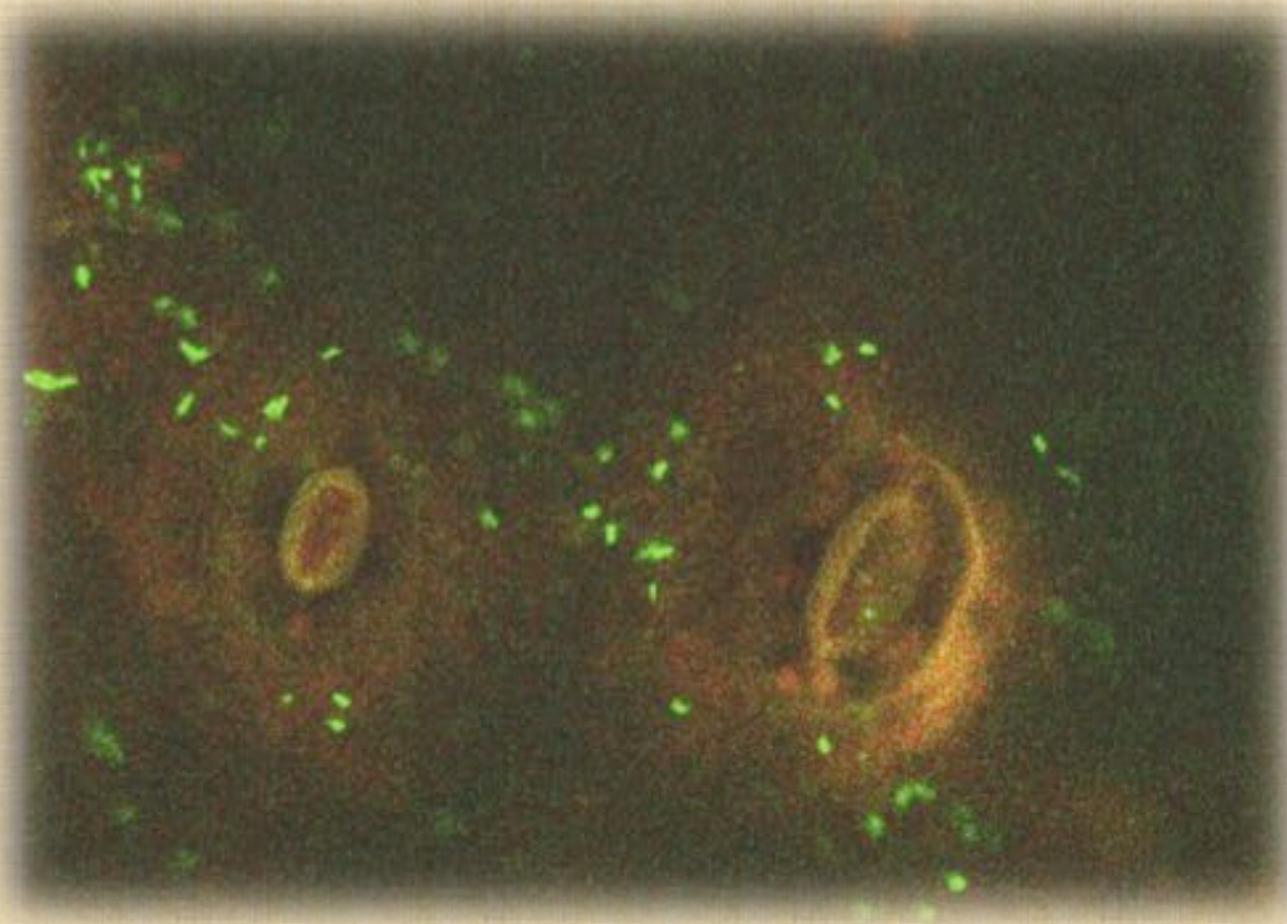


Detección de moléculas capaces de interferir con la formación de biofilm y/o las señales de quórum sensing en *Xanthomonas citri* subesp. *citri*

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Sub Área Microbiología

Diciembre 2014



Estudiante: Nadia Riera

Orientador: Nian Wang

Co-orientadora: Alicia Arias

Tribunal: Inés Ponce de León, Silvana Vero, Silvia Batista

Este trabajo fue realizado en laboratorio de Citrus Pathology and Bacteriology del Citrus Research and Education Center (CREC) en Lake Alfred, Florida, Estados Unidos. Este laboratorio está a cargo de Nian Wang profesor asociado del Department of Microbiology and Cell Science de la Universidad de Florida. Allí se realizaron todos los experimentos mostrados en esta tesis.

Este trabajo tuvo la co-orientación de Alicia Arias desde el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas (IIBCE) en Montevideo, Uruguay.

Agradecimientos

A todo el Laboratorio de Ecología Microbiana (LEM) y sus extensiones, todos me apoyaron mucho. Los llevo todos los días conmigo en una hermosa bombilla con un búho.

Muy especialmente a Natalia y Alicia, cuyo apoyo incondicional me dio fuerza para el viaje y durante todo el camino. Muy especialmente a Alicia, cada email llegaba siempre como una inyección de energía, siempre con el formato “Si se puede, veremos cómo”.

Agradezco también a mi tribunal de PEDECIBA: Inés Ponce de León, Silvana Vero y Silvia Batista que aceptaron corregirme esta tesis con todas las complicaciones de la distancia.

En el otro hemisferio tengo que agradecer enormemente a Nian Wang, que inmediatamente me abrió las puertas de su laboratorio para realizar este trabajo. Tengo que agradecer también toda la ayuda de mis compañeros de laboratorio del día a día, que me ayudaron con las nuevas técnicas, la integración, el transporte hacia el laboratorio y hasta el idioma! En especial a Neha, Samiksha, Max, Xiaofeng, Qing y Dr. Li.

Al Department of Microbiology and Cell Science de la University of Florida y en especial a todo el CREC (Citrus Research and Education Center) por todas las instalaciones y todo el material necesario para esta investigación. En especial a Craig Davis y Pedro González, por la ayuda con la microscopía confocal.

A mi familia, en especial a mis padres, que como siempre mantienen una fe ciega en mi y absolutamente todas mis locuras.

A mi familia elegida, esos amigos que siempre están ahí para todas mis preguntas, mis amiguitos nerd también estuvieron a la distancia: flopy, santi, yan, mauri, toma y lu. Aprovecho a agradecer al grupete Todo-Está-Bien también, divinas todas.

Y a Martín, claro, caminando a mi lado y manteniendo mi salud mental en los años más huracanados de mi vida.

Índice

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
ENFERMEDAD DEL CANCRO EN CÍTRICOS	12
BACTERIA CAUSAL, <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBESP. <i>CITRI</i>	13
CONTROL DE LA ENFERMEDAD DEL CANCRO	13
BIOFILM	14
FORMACIÓN Y DISPERSIÓN	14
MODELO DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM EN XCC Y GENES ASOCIADOS	15
MOLÉCULAS ORGÁNICAS CANDIDATAS A INHIBIR LA FORMACIÓN DE BIOFILM	17
Moléculas donadoras de óxido nítrico	17
Antibióticos	20
Sulfatiazol	20
Fluoruracilo	21
D-aminoácidos	21
DSF, ácido <i>Cis</i> – 11- metil-2-dodecanoico	22
QUORUM SENSING EN <i>XANTHOMONAS</i> SPP.	23
DSF PARA ELUDIR LA INMUNIDAD INNATA DE LA PLANTA	23
INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS	24
ANTECEDENTES	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
GENERAL	29
ESPECÍFICOS	29
ESTRATEGIA	31
MATERIALES Y MÉTODOS	34
MICROORGANISMOS	34
COMPUESTOS QUÍMICOS	34
MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA	35
MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA EN COMBINACIÓN CON SULFATO DE COBRE.	36
ANÁLISIS DE DATOS	37
ENSAYO DE FENOTIPO	37
ENSAYO DE FORMACIÓN DE BIOFILM EN SUPERFICIE ABIÓTICA	38

PLACAS DE POLIESTIRENO	38
ENSAYO DE FORMACIÓN DE BIOFILM EN SUPERFICIES BIÓTICAS	38
EN FRUTO	38
EN HOJA	39
CURVA DE CRECIMIENTO	39
EN HOJA	39
EN FRUTO	40
ANÁLISIS DE DATOS	40
MONITOREO DEL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD EN FRUTO Y EN HOJA	40
EN HOJA	41
MICROSCOPIA CONFOCAL LASER DE BARRIDO	41

RESULTADOS 42

BÚSQUEDA DE CANDIDATOS PARA LA INHIBICIÓN DE QUORUM SENSING Y FORMACIÓN DE BIOFILM	42
MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA	42
Donadores de óxido nítrico	42
Antibióticos, DSF e inhibidores de la síntesis de ácidos grasos	43
D - aminoácidos	44
ENSAYO DE FORMACIÓN DE BIOFILM EN SUPERFICIE ABIÓTICA	45
Donadores de óxido nítrico	45
Antibióticos y DSF	45
D-aminoácidos	46
ENSAYO DE FENOTIPO	47
MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA EN COMBINACIÓN CON SULFATO DE COBRE	48
1. EFECTO DE D-ARGININA Y SULFATO DE COBRE EN EL DESARROLLO DE INFECCIÓN	51
MONITOREO DEL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD EN FRUTO	51
ENSAYO DE FORMACIÓN DE BIOFILM EN SUPERFICIES BIÓTICAS (HOJA Y FRUTO)	52
2. ROL DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM Y LA SEÑALIZACIÓN POR QUÓRUM SENSING EN LA INFECCIÓN DE XCC	53
MONITOREO DEL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD EN HOJA	54
Curva de crecimiento y desarrollo de síntomas	54
MONITOREO DEL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD EN FRUTO	56
Curva de crecimiento y desarrollo de síntomas en pomelo Duncan	56
Curva de crecimiento y desarrollo de síntomas en naranjo valenciano	57
MICROSCOPIA CONFOCAL LASER DE BARRIDO EN FRUTO	59

DISCUSIÓN 62

• BÚSQUEDA DE INHIBIDORES	62
MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA	62
Donadores de óxido nítrico	62
DSF	62
Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos	63
Antibióticos	63
D-aminoácidos	63
INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM	63
Donadores de óxido nítrico	64
Antibióticos	65
D-aminoácidos	65
INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE SEÑALES DE QUORUM SENSING	66
Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos	66
• EFECTO DE SULFATO DE COBRE CON D-ARGININA EN EL PROCESO DE INFECCIÓN Y LA FORMACIÓN DE BIOFILM.	67
PROCESO DE INFECCIÓN	67
FORMACIÓN DE BIOFILM EN HOJAS Y FRUTO	68
• ROL DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM Y QUORUM SENSING EN EL PROCESO DE INFECCIÓN DE XCC	68

LA FORMACIÓN DE BIOFILM Y EL PROCESO DE INFECCIÓN	68
QUORUM SENSING Y EL PROCESO DE INFECCIÓN	69
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS	72
APÉNDICE I	77
LISTA DE ABREVIATURAS	77
APÉNDICE II	78
MEDIOS DE CULTIVO	78

Índice de figuras

Figura 1 A) Esquemización del ciclo de la enfermedad del cancro en cítricos Fuente: Gottwald et al., 2002, B) Síntomas de cancro en hojas y fruto de naranjo valenciano en campo, Florida, USA.	12
Figura 2 Representación esquemática de las cinco etapas en el ciclo de formación de biofilms (1-5). Imágenes obtenidas con microscopía confocal de un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (a-e), fuente: Stoodley et al., 2002.....	14
Figura 3 Modelo de la formación de biofilm en Xcc y los genes implicados en cada etapa. Fuente: Li & Wang, 2011.....	16
Figura 4 Modelo de la síntesis y degradación de GMP dicíclico.	16
Figura 5 Modelo de la regulación intracelular disparada por DSF Fuente: Dow et al., 2006.	17
Figura 6 Estructura química del antibiótico sulfatiazol.....	20
Figura 7 Estructura química del antibiótico fluoruracilo y la base nitrogenada uracilo.....	21
Figura 8 Estructura química de DSF de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	22
Figura 9 Xcc muestra diferente fenotipo en ausencia o presencia de DSF. Fuente: Crossman & Dow 2004.....	23
Figura 10 Modelo de las diferentes formas de sensado de DSF en <i>Xanthomonas</i> Fuente: An et al., 2014	24
Figura 11 Diagrama de flujo del trabajo.....	32
Figura 12 Mínima concentración inhibitoria, donadores de óxido nítrico.	43
Figura 13 Mínima concentración inhibitoria de inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, antibióticos y DSF..	44
Figura 14 Mínima concentración inhibitoria, D-aminoácidos	44
Figura 15 Efecto de los donadores de óxido nítrico en la formación de biofilm. Las barras de error muestran el desvío estándar y los asteriscos las diferencias significativas con el control (test de t, p menor o igual a 0,05).	45
Figura 16 Efecto de antibióticos y DSF en la formación de biofilm. Las barras de error muestran el desvío estándar y los asteriscos las diferencias significativas con el control (test de t, p menor o igual a 0,05).	46
Figura 17 Efecto de D-aminoácidos en la formación de biofilm. Las barras de error muestran el desvío estándar y los asteriscos las diferencias significativas con el control (test de t, p menor o igual a 0,05).	47
Figura 18 Prueba de inhibidores de señalización por quórum sensing en ensayo de fenotipo. A) Fenotipo de la cepa salvaje (creciendo en forma dispersa) y la cepa Xcc: $\Delta rpfF$ (creciendo formando agregados) en medio XVM2 líquido y B) Efecto de los tres inhibidores de ácidos grasos en el fenotipo de Xcc.	48
Figura 19 MIC de inhibidores en combinación con diferentes concentraciones de cobre. A) Antibióticos, B) DSF y donadores de óxido nítrico y C) D-aminoácidos.	50
Figura 20 Efecto de D - arginina y sulfato de cobre en la infección de Xcc en fruto. A) Monitoreo del desarrollo de síntomas, B) Curva de crecimiento.....	52
Figura 21 Ensayo de formación de biofilm en superficie biótica (fruto).	53
Figura 22 Ensayo de formación de biofilm en superficie biótica luego de 48 hs (hoja). A) Control con Xcc , B) Xcc en D-arg 5 mM, C) control con agua y D) Xcc con D-arg 10 mM.....	53

Figura 23 Monitoreo de síntomas en pomelo Duncan. Imágenes del desarrollo de lesiones en la superficie abaxial a los catorce y veintiún días post inoculación.	54
Figura 24 Monitoreo de síntomas en naranjo Valenciano. Imágenes del desarrollo de lesiones en la superficie abaxial a los catorce y veintiún días post inoculación.	55
Figura 25 Curva de crecimiento en hoja para pomelo Duncan y naranjo Valenciano. Las barras de error representan el error estándar y los asteriscos muestran $p \leq 0,05$ en test de T.....	56
Figura 26 Monitoreo del desarrollo de la enfermedad en fruto. Imágenes de frutos A) naranjo Valenciano y B) pomelo Duncan luego de seis y nueve días post inoculación.	58
Figura 27 Curva de crecimiento en fruto. Las barras de error representan el error estándar y los asteriscos muestran $p \leq 0,05$ en test de T.....	58
Figura 28 Microscopía confocal de la superficie de naranjo Valenciano y pomelo Duncan.	60
Figura 29 Microscopía confocal laser de sección transversal de superficie de naranjo Valenciano y pomelo Duncan.	61
Figure 30 Rol de D–aminoácidos en el ciclo de formación de biofilm. Fuente: Cava et al 2011	66

Índice de tablas

Tabla 1 Candidatos a inhibir la formación de biofilm en Xcc.....	18
Tabla 2 D-aminoácidos candidatos a inhibir la formación de biofilm en Xcc.....	22
Tabla 3 Microorganismos utilizados en este trabajo	34
Tabla 4 Donadores de óxido nítrico y antibióticos usados en el ensayo de formación de biofilm.	35
Tabla 5 Compuestos candidatos a inhibir la síntesis de ácidos grasos utilizados en el ensayo de fenotipo..	35
Tabla 6 Compuestos con actividad anti biofilm y anti quorum sensing seleccionados para combinarlos con sulfato de cobre.....	37
Tabla 3 Ensayo de fenotipo.	48
Tabla 4 Eficiencia en la inhibición de crecimiento de Xcc.	51

Resumen

El cancro es una enfermedad que afecta a los cítricos causando lesiones en hoja, tallo y fruto. La bacteria causante de la enfermedad, *Xanthomonas citri* subesp. *citri*, afecta una gran variedad de cítricos causando grandes pérdidas económicas. La bacteria puede propagarse por causas naturales como lluvias y vientos o en forma artificial por la acción del hombre y la utilización de material infectado. El proceso de infección de *Xanthomonas citri* subesp. *citri* es normalmente a través de los estomas o lesiones presentes en la planta y depende en parte de su capacidad de sobrevivir en forma epifítica en la superficie vegetal. La capacidad de formar películas de biofilm y comunicarse mediante señales de quórum sensing son dos formas de alcanzar esta sobrevivencia en el exterior de la planta. Actualmente el método de control más utilizado en campo son formulaciones químicas ricas en cobre, lo cual resulta una amenaza para el medio ambiente además del riesgo de generar cepas resistentes. Este trabajo tuvo como objetivos identificar moléculas orgánicas capaces de interferir en estos dos procesos bacterianos y buscar una combinación prometedora con cobre para ser utilizada como control eficiente de la enfermedad. A su vez, se buscó evidenciar el papel de la formación de biofilm y la señalización por quórum sensing utilizando cepas deficientes en genes implicados en estos procesos.

En primer lugar, se buscaron moléculas orgánicas pequeñas capaces de interferir en la formación de biofilm y la señalización por factores de quórum sensing e interferir así en su capacidad de sobrevivir las adversidades del ambiente previas al establecimiento de la infección. Para este primer objetivo se utilizaron donadores de óxido nítrico, D – aminoácidos, antibióticos y DSF como candidatos a interferir con la formación de biofilm e inhibidores de la síntesis de ácidos grasos como inhibidores de la señalización por quórum sensing. Para los potenciales inhibidores de la formación de biofilm, se observó un efecto de algunos de estos compuestos en superficie abiótica en medio mínimo y medio rico. Para los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos se probó su capacidad inhibitoria mediante un ensayo de fenotipo. A su vez, se combinaron los compuestos capaces de interferir con uno de estos procesos bacterianos con sulfato de cobre. Se probó la concentración mínima inhibitoria de los compuestos en conjunto con sulfato de cobre y se seleccionó una combinación para ser evaluada en fruto y en superficie biótica. Se encontró que el aminoácido D – arginina en conjunto con sulfato de cobre puede ser una combinación prometedora para controlar la formación de biofilm en *Xanthomonas citri* subesp. *citri* e interferir así en la eficiencia de la infección en cítricos. Se identificó al inhibidor de la síntesis de ácidos grasos triclosán como capaz de interferir con la señalización por quórum sensing.

En segundo lugar, se utilizaron tres cepas deficientes en genes relevantes para la formación de biofilm (*rpjF*, *gumD* y *rflbC*) y en particular de señales de quórum sensing (*rpjF*) para observar el efecto de estos dos procesos en la infección en hoja y fruto. Se realizaron curvas de crecimiento en pomelo Duncan y naranjo Valenciano y se monitoreó el desarrollo de síntomas en cada caso.

Introducción

Enfermedad del cancro en cítricos

La enfermedad del cancro es una de las enfermedades más dañinas y temidas por los productores de cítricos. Esta enfermedad es además una de las más distribuidas mundialmente, aunque su gravedad varía con las diferentes especies y variedades de cítricos, así como también con las condiciones climáticas del país donde se cultiva (A.K. Das, 2003). Los países que tienen la enfermedad del cancro tienen mayores costos de producción, además de que en ciertos casos algunos cultivares son tan susceptibles que no pueden ser cultivados y pierden la posibilidad de comercializar en el mercado nacional e internacional por los embargos y cuarentenas exigidas (Gottwald et al., 2001). Los frutos enfermos son la principal pérdida económica, porque no pueden ser vendidos como frutos frescos (A.K. Das, 2003; Gottwald et al., 2002; Pruvost et al., 2002). Como la enfermedad puede ser diseminada a través de éstos, los países donde la enfermedad no está presente son particularmente estrictos en el comercio de frutos con los países donde existe la enfermedad (Schoulties et al., 1987).

Los síntomas que se pueden ver en las plantas son característicos y se trata de lesiones necróticas con cierto relieve (A.K. Das, 2003; Gottwald et al., 2002). Estas lesiones se pueden observar en hojas, ramas y frutos. En las hojas, se ven inicialmente como lesiones aceitosas circulares, de unos 2-10 mm de diámetro (normalmente del mismo tamaño) (Figura 1). Comúnmente las lesiones aparecen en primera instancia en la zona abaxial de la hoja (A.K. Das, 2003; Casabuono et al., 2011) lo que refleja la entrada de la bacteria a través de los estomas luego de la dispersión por lluvias. La bacteria responsable de esta enfermedad puede dispersarse por lluvias o la acción humana llegando a nuevos tejidos. En la superficie de hojas y frutos esta permanece un tiempo como epifítica donde debe sobrevivir adversidades ambientales. Posteriormente, al desarrollarse la enfermedad, pueden romperse ambas superficies de la epidermis por la hiperplasia causada por el patógeno (A.K. Das, 2003).

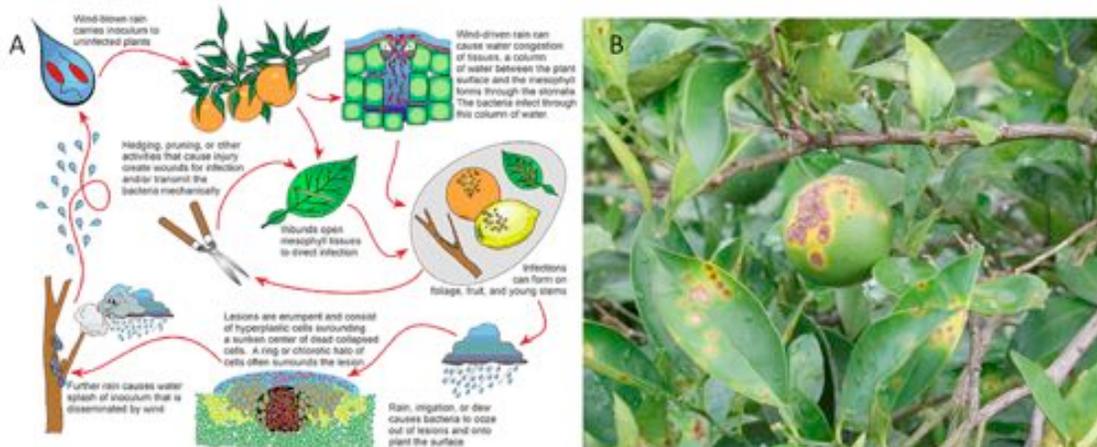


Figura 1 A) Esquemización del ciclo de la enfermedad del cancro en cítricos Fuente: Gottwald et al., 2002, B) Síntomas de cancro en hojas y fruto de naranjo valenciano en campo, Florida, USA.

Bacteria causal, *Xanthomonas citri* subesp. *citri*

Las *Xanthomonas* spp. (del griego xanthos=amarillo, monas=entidad) son un género de bacterias Gram negativas, dentro de las γ -proteobacterias y se caracterizan por su pigmentación amarillenta. Dentro de este género hay registradas hasta ahora veintisiete especies que causan enfermedades en aproximadamente cuatrocientas plantas huéspedes (Ryan et al., 2011). Dentro de éste género, *Xanthomonas citri* subesp. *citri* (Xcc) es una bacteria fitopatógena, agente causal del cancro en los cítricos. La mayoría de los cítricos comerciales son susceptibles a la enfermedad (Gottwald et al., 2002).

Muchas bacterias fitopatógenas colonizan las hojas como epifíticas y luego se vuelven bacterias endófitas a medida que transcurre el proceso de infección (Gottwald et al., 2002; Ryan et al., 2011). Durante su vida como epifíticas, adherirse a la superficie de hojas y frutos es muy importante para el progreso de la infección. . En esta etapa, la formación de películas de biofilm bacterianas es un proceso clave. La probabilidad de infección está directamente relacionada con la población de bacterias epifíticas viviendo en la superficie de la planta (Rigano et al., 2007a). Inicialmente la infección de las hojas se da principalmente por los estomas y heridas (A.K. Das, 2003; Pruvost et al., 2002; Rigano et al., 2007a).

La comunicación mediante factores de quorum sensing y la formación de biofilm son dos procesos bacterianos importantes para la sobrevivencia de Xcc en la superficie de hojas y frutos y conseguir así una infección exitosa. Se cree que mediante la comunicación célula a célula y la formación de estructuras protectoras de biofilm, la bacteria adquiere protección contra adversidades ambientales permitiendo su sobrevivencia y posterior internalización en el tejido de la planta a través de los estomas (Dunger et al., 2007; Rigano et al., 2007a).

El genoma completo de Xcc y otras especies cercanas ha sido secuenciado (Moreira et al., 2010; da Silva et al., 2002). Esto proporciona una gran herramienta molecular para el estudio de muchos procesos bacterianos a nivel genético.

Control de la enfermedad del cancro

La enfermedad se ha eliminado de muchos países a través de inspecciones en viveros, medidas cuarentenarias y la quema de árboles infectados (Das, 2003).

Hoy en día, el control de la enfermedad se basa principalmente en el empleo de prácticas culturales y control químico (Zhang et al., 2010). También son importantes las medidas fitosanitarias ya que la infección se propaga por la acción del hombre y la utilización de equipos infectados (Schoulties et al., 1987). Las formulaciones que se aplican en las plantas se basan fundamentalmente en cobre. La efectividad de estos compuestos depende de la susceptibilidad de la planta, de condiciones ambientales y de cómo esté integrado a otras prácticas de control de la enfermedad. Además, el uso de formulaciones de cobre en forma prolongada tiene efectos adversos en el medio ambiente ya que puede acumularse en los suelos, contaminar cursos de agua y afectar la salud de la planta (Zhang et al., 2010).

Biofilm

Formación y dispersión

La mayoría de las bacterias tienen la capacidad de vivir en agregados formando comunidades celulares llamadas biofilms (Jw et al., 1978). El modo de vida dentro de estos agregados parece ser el preferido por los microorganismos en ambientes naturales y en interacciones patogénicas (Boles et al., 2004; Stoodley et al., 2002). Los biofilms pueden ser definidos como conglomerados de células adheridas a una matriz compuesta de polímeros como exopolisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, entre otros (Rigano et al., 2007a).

En los biofilms las bacterias cambian algunas características fisiológicas con respecto a la forma de vida libre, por ejemplo pueden cambiar su tasa de crecimiento y su diversidad genética (Boles et al., 2004).

En ambientes marinos, las bacterias asociadas a una película de biofilm adquieren protección contra compuestos químicos potencialmente tóxicos, bacteriófagos y amebas patógenas. En sistemas patogénicos, dentro del cuerpo humano por ejemplo, las bacterias patógenas se encuentran más protegidas de la respuesta inmune del hospedero (como anticuerpos y fagocitos) y de posibles tratamientos con antibióticos (Donlan and Costerton, 2002). Se han reportando células bacterianas asociadas a biofilms aproximadamente mil veces más resistentes a tratamientos con antibióticos comparado con las células en vida libre (Brooun et al., 2000). El ciclo de formación de las películas de biofilm comprendería cinco etapas: 1) la adhesión inicial de células libres a una superficie dada, 2) la producción de exopolisacáridos con características adherentes generando una unión "irreversible" a la superficie, 3) el desarrollo inicial de la estructura de biofilm con sus microcolonias, 4) la formación de una estructura madura y finalmente, 5) la dispersión del biofilm liberando células libres capaces de colonizar nuevos nichos (Figura 2)(Stoodley et al., 2002).

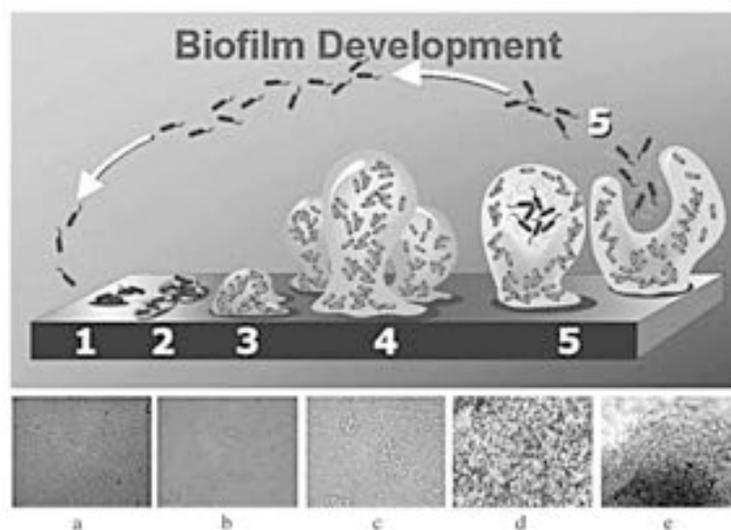


Figura 2 Representación esquemática de las cinco etapas en el ciclo de formación de biofilms (1-5). Imágenes obtenidas con microscopía confocal de un biofilm de *P. aeruginosa* (a-e), fuente: Stoodley et al., 2002.

En bacterias Gram negativas, como Xcc, el segundo mensajero GMP dicíclico (c-di-GMP) es un importante factor responsable de disparar la producción de exopolisacáridos y compuestos extracelulares que desembocan

en la formación de biofilm. La síntesis de GMP dicíclico ocurre gracias a la acción de enzimas llamadas diguanilato ciclasas, las cuales son interesantes blancos para atacar la formación de biofilms (Antoniani et al., 2010).

Modelo de la formación de Biofilm en Xcc y genes asociados

¿Qué genes están implicados en la formación de biofilm para Xcc? El genoma completo de Xcc y otras especies relacionadas ya ha sido secuenciado. Dentro de los genes implicados en la formación de biofilm se encuentran *gumD* y *gumB*, dentro de un cluster de formación de exopolisacáridos que sintetizan xantano (Dunger et al., 2007; Rigano et al., 2007a), además *nxacO* y *rbjC* implicados en la biosíntesis de lipopolisacáridos (Li and Wang, 2011a).

En el modelo propuesto por Li (2011) luego de un estudio genómico utilizando mutagénesis, las bacterias responden a estímulos intra y extracelulares como DSF o los niveles de nutrientes usando adhesinas (como FhaB), y moviéndose hacia determinadas superficies. Inicialmente las células libres se adhieren a una superficie y con suficiente oxígeno y nutrientes se activan genes involucrados en la síntesis, modificación, procesamiento y degradación del ADN (como *winD*, *mpdB* y *nrdf*, entre otros). De esta manera las células comienzan a proliferar y a generar diferentes adaptaciones. En segundo lugar, las células comienzan a activar genes involucrados en la motilidad celular para la formación de flagelos y pilis de tipo IV. En este punto las células crecen en capas y se forman microcolonias de varias capas de células firmemente adheridas entre sí donde algunas pueden diferenciarse fenotípicamente. En las microcolonias el nivel de oxígeno es limitado, de esta manera se activan genes involucrados en la secreción de moléculas. Los sistemas de secreción de tipo II permiten que se secreten xantano y otros polímeros al exterior celular. Además, ADN extracelular y lipopolisacáridos son también secretados al exterior celular lo que promueve el crecimiento vertical de la microcolonia (Li and Wang, 2011b).

Por último, el biofilm maduro puede sufrir eventos de dispersión de células individuales o de fragmentos enteros de la microcolonia. Este fenómeno de dispersión sucede por comunicación célula a célula mediante factores de quórum sensing como DSF (ver Quórum sensing más adelante) (Dow et al., 2003; He et al., 2006a), o por fuerzas mecánicas y daños físicos.

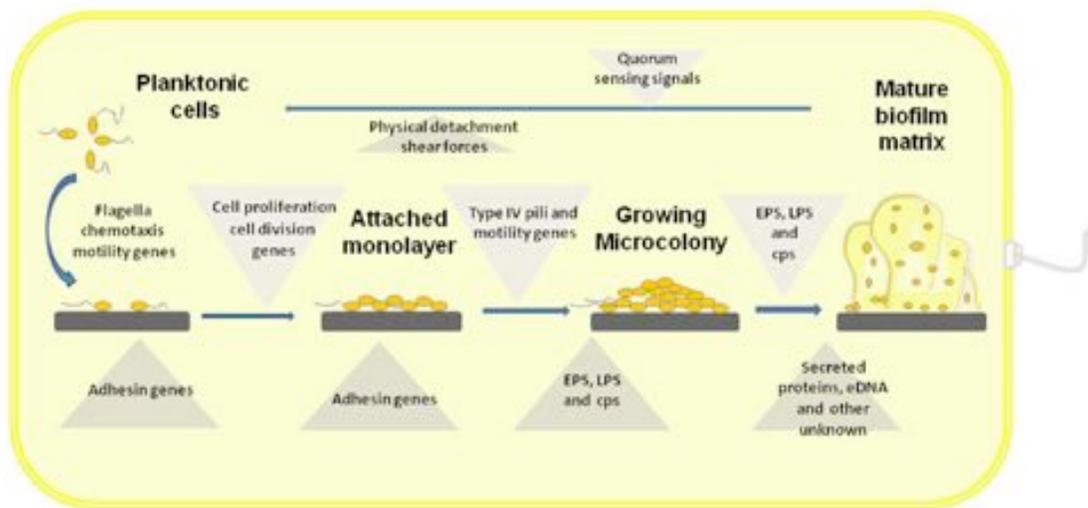


Figura 3 Modelo de la formación de biofilm en Xcc y los genes implicados en cada etapa. Fuente: Li & Wang, 2011.

El segundo mensajero GMP dicíclico es un compuesto que cumple un papel importante en la regulación de la formación de biofilm, motilidad y síntesis de factores de virulencia en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Hasta ahora se han encontrado tres dominios conservados que están implicados en la síntesis y la degradación de este compuesto: el dominio GGDEF (actividad ciclasa), el dominio EAL y el dominio HD-GYP (estos últimos con actividad fosfodiesterasa). Estos dominios se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, incluyendo varias especies fitopatógenas (Ryan et al., 2006). A altos niveles de GMP dicíclico intracelulares se promueve la formación de biofilm, la tendencia a permanecer sésil y el crecimiento de colonias. A bajos niveles, este mensajero promueve la síntesis de factores de virulencia y motilidad celular (Ryan et al., 2006).



Figura 4 Modelo de la síntesis y degradación de GMP dicíclico.

En *Xanthomonas* spp., la concentración intracelular del segundo mensajero GMP dicíclico está relacionada con la señalización por quórum sensing mediante la molécula señal DSF (del inglés, Diffusible Signal Factor) y la activación de rpfG que contiene actividad fosfodiesterasa por su dominio catalítico HD-GYP (ver Quorum sensing más adelante) (Dow et al., 2006; Ryan et al., 2006).

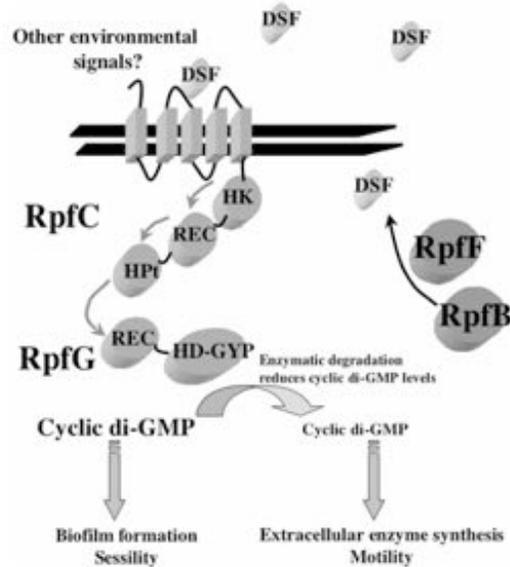


Figura 5 Modelo de la regulación intracelular disparada por DSF Fuente: Dow et al., 2006.

Moléculas orgánicas candidatas a inhibir la formación de biofilm

Moléculas donadoras de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre con la propiedad molecular de ser al mismo tiempo hidrofóbico y soluble en agua. Al ser hidrofóbico y molecularmente pequeño, NO tiene la particularidad de poder difundir libremente a través de las membranas citoplasmáticas en los sistemas biológicos.

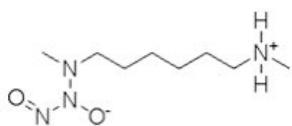
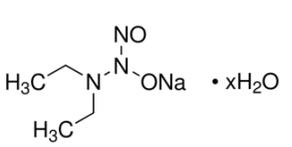
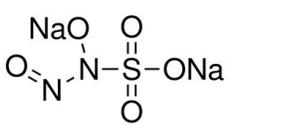
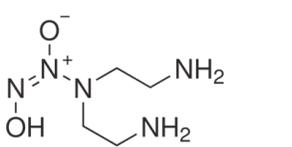
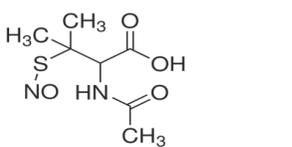
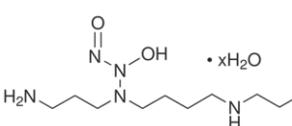
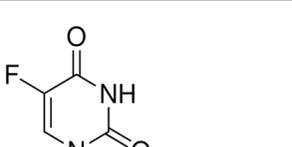
En cultivos líquidos en laboratorio, NO puede ser agregado usando donadores de óxido nítrico. Se llama donadores de óxido nítrico a los compuestos químicos que poseen la capacidad de disociarse espontáneamente en solución acuosa y liberar así NO. Los NONOatos son donadores de óxido nítrico usados frecuentemente en pruebas de laboratorio, su estequiometría de reacción es de dos moles de NO liberados por mol de NONOato. La tabla 1 muestra algunos donadores de óxido nítrico frecuentemente utilizados para producir NO. Estos compuestos difieren en su cinética de reacción y vida media en solución acuosa. Su efecto en inhibir la formación de biofilm será probado en Xcc.

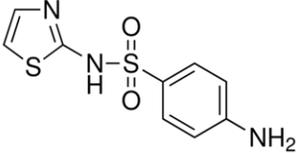
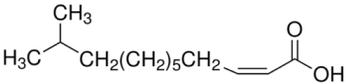
NO puede ser tóxico dentro de las células bacterianas a concentraciones en el rango de μ y mM. En los macrófagos, NO se produce como uno de los oxidantes para el sistema de defensa dentro de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos compuestos oxidantes son liberados como mecanismo de defensa no específico contra bacterias (Zumft, 1993). Se cree además que el efecto citotóxico de NO dentro de la células se puede potenciar a su vez cuando se combina con superóxido (O_2^-) y forma peroxinitrito (ONOO⁻). El peroxinitrito causa daños severos dentro de la célula, puede oxidar grupos sulfhidrilo de las macromoléculas celulares, por ejemplo de proteínas (Radi et al., 1991).

Sin embargo, a pesar de sus efectos dañinos a altas concentraciones, NO también es conocido por tener un rol como molécula señal a bajas concentraciones (en el rango de nM). En los biofilms bacterianos, NO puede ser

generado espontáneamente como intermediario del metabolismo anaerobio bacteriano. En las microcolonias dentro de las películas de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 1 Candidatos a inhibir la formación de biofilm en Xcc

Nombre	Fórmula	Aplicación
MAHMA NONOato		Donador de óxido nítrico
Dietilamina NONOato hidrato de sal sódica (D184)		Usado como donador de óxido nítrico, capaz de liberar cantidades controladas de NO en solución.
Sal disódica sulfo NONOato (S8432)		Compuesto con el grupo NONOato, incapaz de liberar NO en solución. Usado como control negativo en investigaciones con NONOatos.
3,3-bis (aminoetil) -1-hidroxi-2-oxo-1-triazeno (A5581)		Puede generar NO espontáneamente en cantidades controladas.
Nitroprusiato de sodio dihidratado (71778)	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Donador de óxido nítrico
S-nitro-N-acetil-DL-penicilamina (N3398)		Libera óxido nítrico en solución, puede activar guanidil ciclasas.
Complejo óxido nítrico-espermina hidratado (S150)		Donador de óxido nítrico, usado para producir cantidades controladas de NO en solución.
Fluoruracilo		Antibiótico usado en el tratamiento del cancer. Antagonista de Uracilo, capaz de interferir en las vías de señalización de QS en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Reduce la

		formación de biofilm en <i>E. coli</i> .
Sulfatiazol		Capaz de inhibir la actividad diguanilato ciclasa, importante para la síntesis de GMP dicíclico.
Ácido dodecanoico	<p><i>cis</i>-11-metil-2-</p> 	Molécula señal difusible, actúa en el quorum sensing. Activa la transcripción de genes del cluster <i>rpf</i> .

se ha visto que las células pueden mantener un metabolismo anaerobio incluso en condiciones de aerobiosis (Barraud et al., 2006).

Los trabajos de Barraud y colaboradores evidencian un vínculo entre los niveles de NO y las concentraciones intracelulares de GMP dicíclico en *P. aeruginosa*. En este microorganismo se observó que a bajas concentraciones de óxido nítrico se logró inducir la actividad fosfodiesterasa y de esa forma disminuir los niveles de GMP dicíclico promoviendo la dispersión de biofilms. Unos años después, el mismo grupo encontró que el óxido nítrico también está involucrado en la compleja regulación del cambio de una forma de vida planctónica a formando biofilms también a través de cambios en la concentración de GMP dicíclico.

El mecanismo molecular por el cual la concentración de óxido nítrico intracelular puede interferir con la formación de biofilm no es del todo claro. Hay evidencia de que el óxido nítrico puede cambiar la expresión génica de *P. aeruginosa* cambiando los niveles de GMP dicíclico y por este motivo es posible considerar que el mecanismo podría estar conservado en otras especies diferentes. Si bien el mecanismo que relaciona los niveles de óxido nítrico y los niveles de GMP dicíclico no está elucidado, se han encontrado proteínas en el genoma de *P. aeruginosa* que contienen dominios capaces de sensar el estado redox como PAS y H-NOX asociados a dominios GGDEF y EAL. Estos dos últimos están normalmente asociados con la actividad diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa que regulan la formación y degradación de GMP dicíclico respectivamente (Barraud et al., 2009). GGDEF y EAL son dos dominios que regulan la concentración intracelular del segundo mensajero c-di-GMP.

Antibióticos

Se ha encontrado que algunos antibióticos, como los aminoglicósidos, son capaces de inducir la formación de biofilm (Hoffman et al., 2005). Otros, en cambio son capaces de inhibir este mismo fenómeno. Dos antibióticos con estas características son sulfatiazol y fluoruracilo.

Sulfatiazol

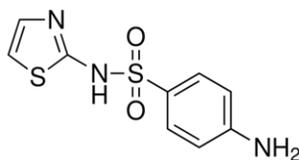


Figura 6 Estructura química del antibiótico sulfatiazol.

El antibiótico sulfatiazol ha sido reportado como inhibidor de la formación de biofilm en *Escherichia coli* a concentraciones subletales de 5.8 μM . El mecanismo por el cual esta inhibición es posible es a través de la inhibición de las diguanilato ciclasas (DGC). Las DGC contienen dominios conservados GGDEF, importantes en la catálisis y formación del segundo mensajero GMP dicíclico (Antoniani et al., 2010; Landini et al., 2010). Las enzimas DGC son consideradas un interesante blanco para inhibir la formación de biofilm (Antoniani et al., 2010).

La inhibición de las DGC por la acción de sulfatiazol se supone que es indirecta, y no directamente por unión del antibiótico al sitio activo de la enzima. Sulfatiazol pertenece a la clase de antibióticos sulfonados, que pueden inhibir la síntesis de tetrahidrolatos (THF) a través de la interacción con dihidropteroatos sintetas FolP (Vedantam and Nichols, 1998).

Fluoruracilo

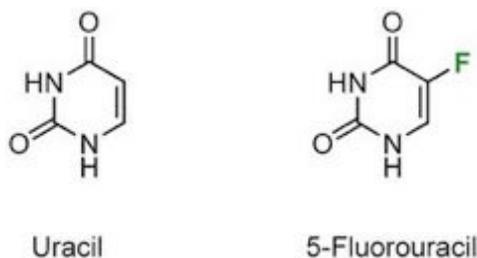


Figura 7 Estructura química del antibiótico fluoruracilo y la base nitrogenada uracilo

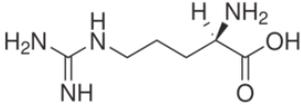
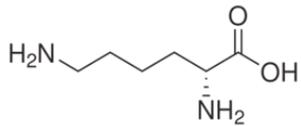
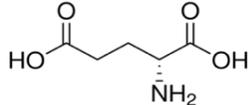
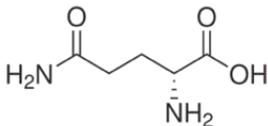
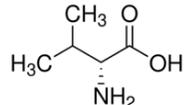
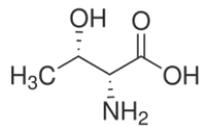
Fluoruracilo (también conocido como 5-FU) es un análogo de la base nitrogenada uracilo, y es usado ampliamente en el tratamiento contra el cáncer. Estructuralmente es muy similar a la base pirimidinica uracilo, pero con la sustitución por un fluor en el carbono cinco. Ueda y colaboradores mostraron como este antibiótico puede inhibir la formación de biofilm en *P. aeruginosa* interfiriendo en tres caminos de señalización de quórum sensing (Ueda et al., 2009). En este mismo trabajo, los autores dan evidencia molecular de que fluoruracilo tiene un papel importante en el control de la comunicación por quórum sensing en *E. coli* y *Pseudomonas sp.* Además se ha mostrado que fluoruracilo puede inhibir la formación de biofilm de *E. coli* actuando a través de AriR (Attila et al., 2009). AriR es un regulador con un importante rol en la resistencia a ácidos controlando la formación celular y motilidad en *E. coli* (Lee et al., 2007).

D-aminoácidos

D-aminoácidos son metabolitos secundarios comunes en bacterias. Un estudio hecho en *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa* muestra que ciertos D-aminoácidos pueden incrementar la dispersión de biofilms. Dentro de estos compuestos se ha visto que D-metionina, D-leucina, D-triptófano y D-tirosina son efectivos impidiendo la formación de biofilm en *B. subtilis*. También se ha comprobado en esta bacteria que sus enantiómeros de conformación L no tienen ningún efecto sobre los biofilms. Estos aminoácidos tienen un efecto actuando en forma individual a concentraciones en el rango μ -mili molar pero usándose en combinaciones se ha visto incrementada su acción de forma significativa actuando a concentraciones del orden de 10 nM (Hochbaum et al., 2011).

Los D-aminoácidos no inhiben el crecimiento bacteriano, ni tampoco interfieren con la expresión de genes asociados a la formación de biofilm en bacterias. El mecanismo por el cual estos compuestos pueden interferir con los biofilms es provocando la dispersión de biofilms interfiriendo con la formación de la pared celular. La hipótesis con respecto a su acción es que algunos D-aminoácidos pueden reemplazar la D-alanina en las cadenas de peptidoglicano haciendo que se desacoplen las fibras de su normal asociación en la pared celular (Kolodkin-Gal et al., 2010).

Tabla 2 D-aminoácidos candidatos a inhibir la formación de biofilm en *Xcc*.

Nombre	Fórmula
D-arginina	
D-lisina	
D-ácido glutámico	
D-glutamina	
D-valina	
D-treonina	

DSF, ácido *Cis* – 11- metil-2-dodecanoico

La molécula DSF es un ácido graso descubierto por primera vez en 1997, en los estudios de Barber y colaboradores en *Xanthomonas campestris* patovar *campestris* (Barber et al., 1997).

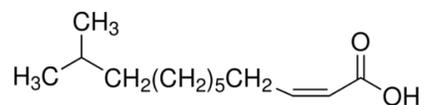


Figura 8 Estructura química de DSF de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

En 2003, Dow y colaboradores encontraron un nuevo rol de esta molécula. Además de su papel en la señalización: encontraron que la molécula DSF podía inducir la dispersión de biofilm en cepas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* mutantes en el gen *rpfF* (gen que codifica una posible enoil sintasa, responsable de la síntesis de DSF endógeno) (Dow et al., 2003). El mecanismo por el cual esta molécula puede interferir en las películas de biofilm no ha sido elucidado aun.

En 2004, Crossman y Dow descubrieron que Xcc puede crecer de forma diferencial en ausencia o presencia de DSF. La cepa mutante deficiente en *rpfF*, crece en ciertos medios líquidos formando agregado moleculares mientras que la cepa salvaje crece en forma normal dispersa. El fenotipo en forma de agregados de la cepa mutante puede revertirse agregando DSF en forma exógena y el cultivo recupera el fenotipo normal (Crossman and Dow, 2004).



Figura 9 Xcc muestra diferente fenotipo en ausencia o presencia de DSF. Fuente: Crossman & Dow 2004

Quorum Sensing en *Xanthomonas* spp.

DSF para eludir la inmunidad innata de la planta

La señalización por quórum sensing es un mecanismo complejo que permite a las bacterias sentir la densidad de población y cambiar su comportamiento en forma coordinada. Este fenómeno fue descubierto por primera vez en 1979 in un estudio realizado en *Vibrio fischeri* donde se observó que la bacteria era capaz de controlar la producción de bioluminiscencia en respuesta a la densidad de población (Nealson and Hastings, 1979). Muchas bacterias pueden producir compuestos que difunden por la membrana al ambiente extracelular donde pueden acumularse. Luego de acumularse suficientemente como para traspasar un cierto umbral de concentración del compuesto, este es reconocido por la bacteria y como consecuencia se producen cambios en la expresión génica terminando en cambios en el comportamiento.

DSF es un ácido graso insaturado, y es la molécula señal utilizada para la señalización de quórum sensing en *Xanthomonas* spp.. Últimamente también se ha asociado esta molécula con la señalización de otras especies bacterianas como *Burkholderia cenocepacia* y *P. aeruginosa* (Boon et al., 2007; Davies and Marques, 2009; Deng et al., 2010).

En *Xanthomonas* spp., la producción y percepción de DSF está regulada por genes que se encuentran en el operón *rpf* (del inglés, regulation of pathogenicity factors). Este operón contiene tres genes en particular que

son fundamentales para su producción y sentido: 1) El gen *rpfF* que codifica una supuesta enoil-CoA hidratasa involucrada directamente en la catálisis de DSF; 2) el gen *rpfC* y 3) *rpfG* que codifican una proteína sensora y un regulador respectivamente. En *Xanthomonas* spp. *rpfC* y *rpfG* forman en conjunto un sistema de dos componentes que permite sentir el DSF y acoplarlo a cambios en la expresión génica bacteriana como respuesta (Ryan and Dow, 2011). El regulador *rpfG* tiene un dominio catalítico HD-GYP con actividad fosfodiesterasa, capaz de disminuir las concentraciones de GMP dicíclico intracelulares con consecuencias en la expresión génica. A bajas concentraciones de este segundo mensajero se produce un aumento en la síntesis de enzimas extracelulares y de la motilidad. Además de la producción de DSF, el operón *rpf* controla también la producción de factores de virulencia y de enzimas extracelulares como proteasas, endomanasas y el polisacárido xantano (Ryan et al., 2006).

Recientemente, el grupo de Dow ha descubierto otro regulador intracelular denominado *rpfS* que es capaz de sentir DSF cambiando la expresión génica de otro conjunto de genes diferente a los que controla *rpfG* (An et al., 2014). Algo interesante es que este nuevo regulador *rpfS* contiene un dominio conservado PAS, capaz de sentir el estado redox.

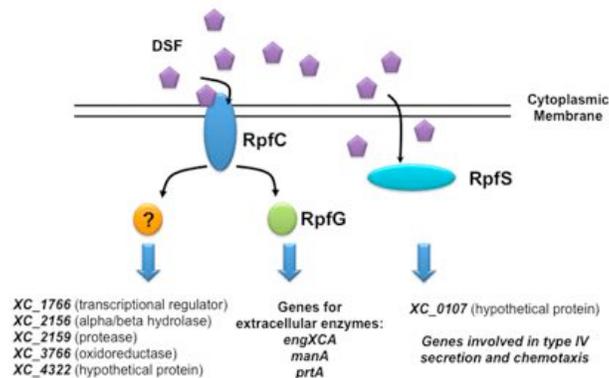


Figura 10 Modelo de las diferentes formas de sentido de DSF en *Xanthomonas* Fuente: An et al., 2014.

Se ha visto que muchos procesos bacterianos importantes son regulados por la familia de moléculas DSF. Entre estos procesos se encuentran la formación de biofilm, la tolerancia a antibióticos y la producción de factores de virulencia (Deng et al., 2010). Se ha descubierto que la producción de moléculas de la familia de DSF no está restringida solo a las bacterias sino que se ha visto también que es posible la comunicación entre dominios (Dow et al., 2003).

Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos

Debido a la naturaleza lipídica de la molécula DSF, y su composición con un enlace insaturado, una posible manera de inhibir su síntesis es mediante la inhibición de la síntesis de ácidos grasos. Aunque no se han probado directamente en *Xanthomonas* spp., algunos inhibidores de ácidos grasos presentan una estrategia interesante para interferir en la comunicación bacteriana. Compuestos como triclosán e isoniazida son regularmente utilizados como agentes antimicrobianos debido a su capacidad de retardar el crecimiento bacteriano (Campbell and Cronan, 2001a). La cerulenina también ha sido utilizada como un potente compuesto antimicrobiano. Estos tres

compuestos deben su actividad antimicrobiana a su capacidad de interferir en la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias.

Isoniazida

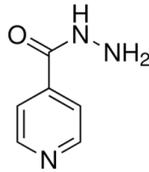


Figura 6 Estructura química de la isoniazida

La isoniazida es un compuesto capaz de inhibir la actividad catalítica de las enoil reductasas. Esta molécula es ampliamente utilizada en especial contra micobacterias, en particular en el tratamiento contra la tuberculosis. Una característica del grupo de las micobacterias es poseer una larga cadena de ácidos micólicos anclados en la pared celular. La isoniazida es un potente inhibidor de la biosíntesis de ácidos micólicos (Campbell and Cronan, 2001a).

Triclosán

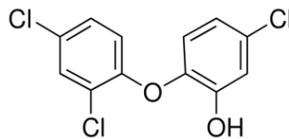


Figura 7 Estructura química del triclosán

El compuesto triclosán es un potente inhibidor de la biosíntesis de ácidos grasos y debe su actividad inhibitoria a su capacidad de interactuar con la enzima enoil-ACP reductasa. La estructura molecular de triclosán es la de un bifeníl-eter con tres sustituciones de cloruros. Su blanco intracelular es análogo al de isoniazida, se cree que dentro de la célula interacciona con enoil-ACP reductasa ocupando un pequeño hueco hidrofóbico de la enzima y provocando como consecuencia un cambio conformacional que impide su actividad catalítica.

Hoy en día triclosán se encuentra presente en múltiples productos de limpieza e higiene como agente antimicrobiano activo. Algunos ejemplos son: pasta de dientes, jabón de manos, plásticos entre otros. Algunos científicos consideran que el sobreuso de este agente puede conducir pronto al desarrollo de cepas resistentes a este inhibidor de la enoil reductasa bacteriana (Campbell and Cronan, 2001b).

Cerulenina

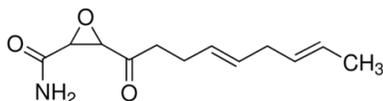


Figura 8 Estructura química de la cerulenina.

La cerulenina fue aislada por primera vez del hongo *Cephalosporium caeruleus* (Omura, 1976). Este compuesto es capaz de inhibir la enzima 3-oxoacil-ACP sintasa, una enzima importante en la biosíntesis de ácidos grasos tanto saturados como insaturados (Buttke and Ingram, 1978; Ulrich et al., 1983).

El mecanismo de acción por el cual la cerulenina puede inhibir la enzima 3-oxoacil-ACP sintasa de tipo I y II es mediante la interacción con un residuo de cisteína en el sitio activo de ésta (Kauppinen et al., 1988; Price et al., 2001). Según los trabajos de Price, la cerulenina es capaz de mimetizar la conformación del estado de transición de la reacción y como consecuencia inhibe la actividad catalítica de la enzima (Price et al., 2001). Se cree que su anillo epóxido ubicado en su cabeza hidrofílica es capaz de interactuar con la enzima y disminuir así la interacción del sustrato con el sitio activo.

Tabla 3 Candidatos a inhibir quórum sensing.

Nombre	Fórmula	Aplicación
Cerulenina		Cerulenina, un antibiótico y antifúngico, es un inhibidor de la biosíntesis de ácidos grasos.
Isoniazida		Antibiótico usado para el tratamiento de micobacterias (muy importante para el tratamiento de tuberculosis). Inhibe la biosíntesis de ácido micólico actuando sobre enoil – ACP reductasa.
Triclosán		Agente antimicrobiano de amplio espectro. Actúa inhibiendo la enzima enoil – ACP reductasa, componente de la vía de síntesis de ácidos grasos de tipo II en bacterias.

Antecedentes

Cada vez hay más evidencias de la importancia de los procesos de quorum sensing y la formación de biofilm en *Xanthomonas* spp. para lograr una eficiente infección (Rigano et al., 2007a). La sobrevida sobre la superficie de la planta parece ser fundamental para permitir la entrada de la bacteria por los estomas o heridas en hojas y fruto.

En el laboratorio de Citrus Pathology and Bacteriology a cargo del profesor Nian Wang en el CREC (Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, Florida, Estados Unidos) de la UF (University of Florida), se han estudiado los procesos de formación de biofilm y quórum sensing de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* 306.

En el contexto de comprender la importancia de la señalización por quórum sensing dependiente de DSF, se estudió el efecto de cepas mutantes en la producción de DSF en el proceso de infección (Guo et al., 2012). Se observó que esta molécula tiene un rol fundamental en el proceso de señalización y es importante además para lograr una infección eficiente.

En un estudio previo realizado en este laboratorio, se identificaron 92 genes implicados en la formación de biofilm por esta cepa, entre ellos *colR*, *fhaB*, *fliC*, *galU*, *gumD* y *rbfC*. Se observó también que muchos caminos de señalización están implicados en la formación de biofilm, siendo uno de ellos la señalización por quórum sensing mediada por DSF (Li and Wang, 2011a).

En el contexto de interferir con la formación de biofilm y la señalización por quórum sensing se observó también que ciertos compuestos químicos pueden interferir con la formación de biofilm y disminuir la densidad de Xcc en planta (Li and Wang, 2013). En este trabajo se observa el efecto en la infección de Xcc mediante la aplicación foliar de inhibidores de la formación de biofilm.

Hipótesis

Es posible mejorar el control de la enfermedad del cancro en cítricos interfiriendo con la capacidad de Xcc de formar películas de biofilm y/o comunicarse por señales de quórum sensing en la superficie de hojas y frutos.

A través de la utilización de pequeñas moléculas orgánicas, es posible inhibir estos dos procesos bacterianos comprometiendo la sobrevivencia epifítica de Xcc.

Las pequeñas moléculas orgánicas inhibidoras pueden ser posteriormente aplicadas en campo en combinación con formulaciones basadas en cobre en menor concentración a la usada actualmente, disminuyendo el daño ambiental y el riesgo de generación de cepas resistentes.

Objetivos

General

Identificar moléculas capaces de interferir con la formación de biofilm y/o señalización por factores de quórum sensing en *X. citri* subesp. *citri* y evaluar el efecto que tienen estos dos procesos en la infección en cítricos.

Específicos

- 1) Identificar moléculas orgánicas que puedan interferir con la formación de biofilm en la bacteria Xcc.
- 2) Identificar moléculas orgánicas que puedan inhibir las señales de quórum sensing en Xcc.
- 3) Confirmar el rol que tienen la formación de biofilm y las señales de quórum sensing durante la infección de Xcc en plantas.
- 4) Evaluar el efecto de los inhibidores de la formación de biofilm y/o señalización por quórum sensing seleccionados en conjunto con formulaciones de cobre comerciales en la efectividad de la infección de Xcc.

Estrategia

Con el fin lograr inhibir la señalización mediante quórum sensing y/o la formación de biofilm de la bacteria *Xanthomonas citri* subesp. *citri* se buscarán moléculas orgánicas capaces de interferir en estos procesos bacterianos. Las moléculas candidatas para la búsqueda de inhibidores de quórum sensing serán moléculas inhibitoras de la síntesis de ácidos grasos, capaces de interferir con el metabolismo lipídico bacteriano e interferir así con la síntesis de DSF. Se probará el efecto de cerulenina, triclosán e isoniazida de cambiar el fenotipo de la bacteria salvaje. Este ensayo de fenotipo supone que la bacteria crece formando agregados celulares en medio líquido cuando no es capaz de producir DSF y crece de manera normal (sin agregados) cuando sí puede producir este compuesto (Dow et al., 2006).

Como posibles inhibidores de la formación de biofilms se verá el efecto de donadores de óxido nítrico, DSF, D-aminoácidos y dos antibióticos (ver tabla 1 y 2 en Introducción). Para todos los compuestos orgánicos utilizados en estos dos ensayos, se comprobará que la concentración mínima inhibitoria sea mayor a las concentraciones empleadas.

Se verá el efecto de los inhibidores seleccionados en combinación con formulaciones de cobre aplicados a la superficie de frutos en la infección de Xcc en cítricos. Se probará la concentración mínima inhibitoria de la combinación de compuestos así como también la sobrevivencia de Xcc en la superficie de frutos luego del tratamiento. Se monitoreará también cómo progresa la enfermedad en el tiempo.

Como último paso se probará el rol que tienen los procesos de formación de biofilm y señalización por quórum sensing en la infección de Xcc en cítricos. Para esto, se monitoreará el desarrollo de la enfermedad y se verá la supervivencia en plantas de cepas mutantes en genes relevantes de estos dos procesos.

Además se utilizará microscopía confocal laser de barrido (CLSM) para observar las estructuras de los biofilms formados sobre la superficie de frutos. Para esto se utilizarán bacterias fusionadas con GFP (cepa salvaje y mutante en producción de DSF, *Xcc*; Δrpf) y se verá el proceso de infección en la superficie de frutos de naranjo Valenciano y pomelo Duncan.

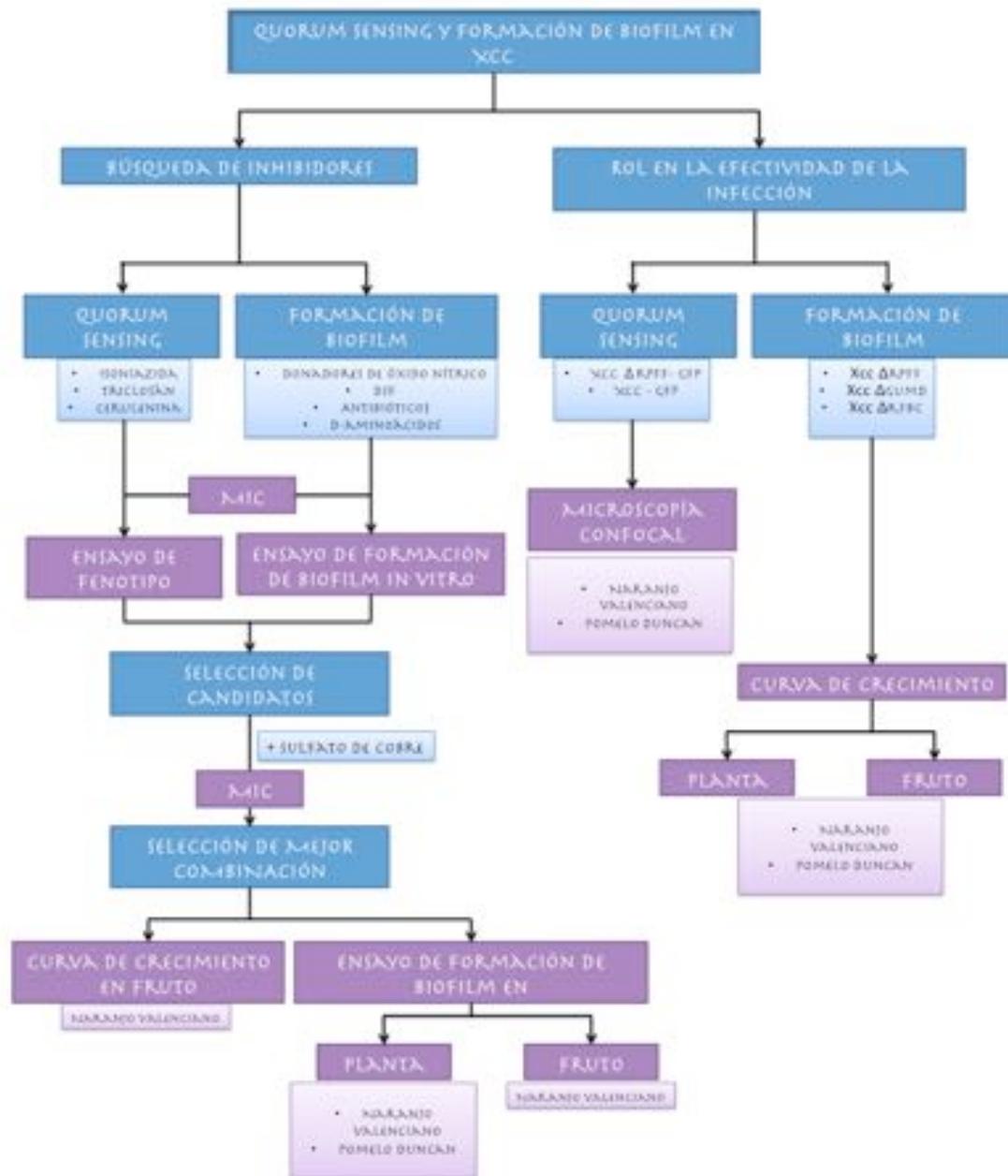


Figura 11 Diagrama de flujo del trabajo.

Materiales y métodos

Microorganismos

Todos los microorganismos fueron almacenados a -80 ° C en glicerol 25% y repicados en placas de NA (Nutrient Agar) para ser utilizados (Tabla 3). En los casos que fue necesario, se complementó el medio NA con rifampicina 50 µg/mL, y/o kanamicina 50 µg/mL.

Para aquellos ensayos que requieren inoculación a partir de un caldo de cultivo, los microorganismos a inocular fueron crecidos en NB (Nutrient Broth) a 28° C con agitación a 200 rpm por siete horas. Los cultivos resultantes fueron centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos y resuspendidos en nuevo NB o agua bidestilada estéril hasta la densidad óptica necesaria para el ensayo.

Tabla 3 Microorganismos utilizados en este trabajo

Cepa	Nombre abreviado	Comentario	Referencia o fuente
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306	Xcc	Cepa salvaje, agente causal del cancro en cítricos. Naturalmente resistente al antibiótico rifampicina.	(Rybak et al., 2009)
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 $\Delta rpfF$	Xcc: $\Delta rpfF$	Cepa deficiente en el gen <i>rpfF</i> , incapaz de sintetizar DSF (señal de QS).	(Li and Wang, 2011a)
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 $\Delta gumD$	Xcc: $\Delta gumD$	Cepa deficiente en el gen <i>gumD</i> , menor producción de xantano y otros polisacáridos. Capacidad reducida de formar biofilm.	(Li and Wang, 2011b)
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 $\Delta rfbC$	Xcc: $\Delta rfbC$	Cepa deficiente en el gen <i>rfbC</i> . Capacidad reducida de producir polisacáridos y formar biofilm.	(Li and Wang, 2011a)
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 - GFP	Wt - GFP	Cepa salvaje conteniendo plásmido con el gen GFP.	(Guo et al., 2012)
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 $\Delta rpfF$ -GFP	Xcc: $\Delta rpfF$ -GFP	Cepa $\Delta rpfF$ conteniendo plásmido con el gen GFP.	(Guo et al., 2012)

Compuestos químicos

Como compuestos químicos candidatos a inhibir los procesos de formación de biofilm y quórum sensing se utilizaron donadores de óxido nítrico, antibióticos y DSF en los solventes adecuados para cada caso (Tabla 4). Todos los estos compuestos fueron almacenados en soluciones stock estériles a -20°C. Los seis D-aminoácidos usados en este trabajo (D-lisina, D-arginina, D-glutamina, D-glutamato, D-valina y D-treonina) fueron preparados en soluciones stock en agua bidestilada y almacenados estériles a temperatura ambiente. Los posibles inhibidores de la síntesis de ácidos grasos y candidatos a interferir en la producción de DSF fueron preparados en soluciones stock con los solventes adecuados (Tabla 5) y fueron almacenados a -20°C. Todas las soluciones finales fueron preparadas en el momento del ensayo.

Tabla 4 Donadores de óxido nítrico y antibióticos usados en el ensayo de formación de biofilm.

Nombre	Concentración final	Solvente en solución stock
MAHMA NONOato	100 μ M	Agua bidestilada
Sal dihidratada dietilamina NONOato de sodio (D184)	100 μ M	Agua bidestilada
Sal disódica sulfo NONOato , (S8432)	100 μ M	Agua bidestilada
3,3-Bis (aminoetil)-1-hidroxi-2-oxo- 1-triazeno (A5581)	100 μ M	Agua bidestilada
Nitroprusiato dihidratado de sodio (71778)	100 μ M	Agua bidestilada
S-Nitroso-N-acetil-DL- penicilamina (N3398)	100 μ M	DMSO
Complejo esperamina - óxido nítrico hidratado (S150)	100 μ M	Agua bidestilada
Fluoruracilo	100 μ M, 50 μ M y 25 μ M	Agua bidestilada
Sulfatiazol	100 μ M	NaOH (1 M)
Ácido <i>cis</i> -11-metil-2-dodecanoico (DSF)	100 μ M	DMSO – Agua bidestilada
D–aminoácidos	10 mM	Agua bidestilada

Tabla 5 Compuestos candidatos a inhibir la síntesis de ácidos grasos utilizados en el ensayo de fenotipo..

Nombre	Concentración final	Solvente en solución stock
Cerulena	20 μ M, 40 μ M y 10 μ M	Acetona
Isoniazida	1,25 mM y 0,63 mM	Agua didestilada
Triclosán	20 μ M, 40 μ M y 10 μ M	Acetona

Mínima concentración inhibitoria

Como inóculo de Xcc se utilizó un cultivo líquido en NB crecido overnight (ver Microorganismos en Materiales y métodos). A partir de este medio líquido se resuspendieron las células en medio de cultivo (NB) hasta una

densidad óptica de 0,3 (5×10^7 ufc/mL). El cultivo resultante fue alicuotado y diluido nuevamente, siendo la densidad óptica final probada 0,03.

Cada compuesto fue ensayado a una concentración inicial (listado en Tabla 4 y Tabla 5) y se realizaron nueve subsecuentes diluciones seriadas 1:2. Cada placa fue incubada a 28°C y se midió la densidad óptica a 600 nm luego de 24 y 48 horas.

Se realizó un control positivo de crecimiento sin el agregado de compuestos químicos y un control negativo sin cultivo bacteriano que se utilizó como blanco. Aquellas condiciones que no mostraron crecimiento comparadas con el control negativo luego de 48 horas fueron definidas como la concentración mínima inhibitoria para la cepa Xcc 306. Cada tratamiento fue realizado por cuatriplicado y el experimento se repitió tres veces.

Mínima concentración inhibitoria en combinación con sulfato de cobre.

Se seleccionaron aquellos compuestos que mostraron actividad como inhibidores de la formación de biofilm o quórum sensing. Cada compuesto seleccionado como posible inhibidor fue combinado con sulfato de cobre en diez concentraciones diferentes (100 ppm - 0.78 ppm). En total se probaron 14 condiciones elegidas en base a los datos preliminares del ensayo de formación de biofilm y fenotipo (Tabla 6).

Tabla 6 Compuestos con actividad anti biofilm y anti quorum sensing seleccionados para combinarlos con sulfato de cobre

Compuestos seleccionados	Concentración
D-arginina	5 mM
D-arginina	10 mM
D-glutamina	10 mM
D-glutamato	10 mM
D-valina	10 mM
DSF	100 μ M
D184	100 μ M
S8432	100 μ M
N3398	100 μ M
S150	100 μ M
A5581	100 μ M
M1555	100 μ M
Sulfatiazol	100 μ M
Fluoruracilo	100 μ M
Fluoruracilo	50 μ M
Fluoruracilo	25 μ M
Triclosán	40 μ M
Triclosán	20 μ M

Análisis de datos

Los catorce tratamientos fueron probados a diez concentraciones de sulfato de cobre diferentes, se tomó como mejor tratamiento a aquella combinación compuesto químico más sulfato de cobre que presentara mayor inhibición del crecimiento de Xcc. Para esto se tomaron los datos de la gráfica de densidad óptica a 600 nm en función de la concentración de cobre y se calculó el área bajo la curva de cada tratamiento. Se seleccionó el tratamiento con menor área bajo la curva, y se eligió una concentración arbitraria de 25 ppm de sulfato de cobre (cuatro veces menor a la concentración aplicada actualmente en campo).

Ensayo de fenotipo

Este ensayo se basa en la capacidad de Xcc de crecer en forma diferencial en medio líquido en presencia o ausencia de DSF. En ausencia de DSF Xcc crece formando agregados celulares definidos, sin embargo en condiciones normales crece en forma de dispersión. Para este ensayo se probaron tres compuestos inhibidores de ácidos grasos: cerulenina, isoniazida y triclosán. Cerulenina y triclosán se probaron en tres concentraciones: 40 μ M, 20 μ M y 10 μ M. Isoniazida se probó en dos concentraciones; 1,25 mM y 0,63 mM. Cada compuesto fue colocado en los dos medios de cultivo en frascos Erlenmeyer de 125 mL con un volumen final de 12,5 mL y se

dejaron crecer en agitador a 200 rpm por 24 hs. Como control del ensayo de fenotipo se incubó la cepa salvaje Xcc 306 y la cepa mutante Xcc: Δrpf , incapaz de sintetizar DSF como control positivo de formación de agregados. Se tomaron fotos luego de 24 horas de incubación. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo de formación de biofilm en superficie abiótica

Placas de poliestireno

Xcc fue inoculado en caldo de cultivo NB y crecido a 28 ° C y 200 rpm durante 24 horas. El cultivo resultante fue centrifugado y resuspendido en NB + glucosa (2%) o XVM2 hasta una densidad óptica final de 0,3. La suspensión resultante fue utilizada como inóculo para cada pocillo siendo la densidad óptica bacteriana final del ensayo 1:10 (0,03). Se probaron las siguientes condiciones: donadores de óxido nítrico (S8432, M1555, D184, A5581, 71778, S150) en una concentración de 100 μ M, D-aminoácidos (D-lisina, D-arginina, D-glutamato, D-valina, D-treonina, D-glutamina) en una concentración de 10 mM, fluorouracilo en tres concentraciones 100, 50 y 25 μ M, sulfatiazol y DSF en una concentración de 100 μ M. Además se agregó un control negativo conteniendo solamente el medio de cultivo y un control positivo inoculado con Xcc. Para cada control y cada tratamiento se realizaron ocho repeticiones y cada tratamiento en un volumen final de 150 μ L por pocillo. Se utilizaron placas de fondo plano de 96 pocillos de poliestireno (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates). Las placas fueron incubadas en condiciones estacionarias a 28° C durante 72 horas. Luego de tres días el contenido de cada pocillo fue removido con una pipeta y lavado con 200 μ L de agua bidestilada estéril con cuidado de no remover las películas formadas contra las paredes. Las placas se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente y fueron posteriormente teñidas con 200 μ L de cristal violeta (1%) durante 45 minutos. Se removió el cristal violeta con pipeta y cada pocillo fue lavado dos veces con 250 μ L de agua bidestilada estéril. Las placas fueron invertidas y secadas a temperatura ambiente durante la noche. Se tomaron fotografías de las placas y el biofilm fue medido cuantitativamente agregando 300 μ L de etanol : acetona (80:20) y midiendo la absorbancia a 595 nm usando un espectrofotómetro Agilent 8453-UV-Visible.

Ensayo de formación de biofilm en superficies bióticas

De las catorce condiciones que mostraron actividad como inhibidoras de la formación de biofilm o quórum sensing se eligió la que dio como resultado menor área bajo la curva (ver análisis de datos). Se seleccionó entonces sulfato de cobre 25 ppm en combinación con D-arginina 5 mM y se probó la capacidad de inhibir la formación de biofilm en superficies de hoja y fruto.

En fruto

Se tomaron frutos inmaduros (de 2-3 cm de diámetro) de Naranja valenciano. De cada fruto se cortaron tres discos de 0,6 cm de diámetro y se colocaron en placas de Petri. Se tomaron tres repeticiones y tres tiempos (0, 15 y 24 horas). Se probaron tres condiciones diferentes: inoculación con Xcc como control positivo, Xcc con

sulfato de cobre 100 ppm como control negativo y Xcc con sulfato de cobre 25 ppm y D-arginina 5 mM. Cada disco fue inoculado con 10^9 ufc/mL (0,03 de densidad óptica) de Xcc en un volumen final de 20 μ L resuspendido en agua bidestilada estéril o la solución de D-arginina con sulfato de cobre. Las placas se incubaron a 28 °C y se retiraron para cada tiempo. Cada disco fue lavado cuidadosamente con agua didestilada con pipeta para retirar las células no adheridas a la superficie y secado en estufa a 60°C durante 20 minutos. Luego se tiñeron las células adheridas con cristal violeta (1%) durante 45 minutos y se lavaron con agua dos veces. Se dejaron secar los discos a temperatura ambiente y se tomaron fotos.

En hoja

Se tomaron hojas jóvenes de pomelo Duncan y naranjo Valenciano. Para este ensayo se probó el efecto de D-arginina en combinación con sulfato de cobre (25 ppm) para dos concentraciones de aminoácido diferentes: 5 y 10 mM. Se inoculó cada hoja con cuatro tratamientos: Xcc, Xcc con D-arginina 5 mM y cobre 25 ppm, Xcc con D-arginina 10 mM y cobre 25 ppm y agua como control. En cada caso se inoculó una suspensión de Xcc de aproximadamente 10^7 ufc/mL en agua bidestilada estéril o las soluciones de D-arginina y sulfato de cobre en un volumen final de 20 μ L. Las hojas fueron incubadas a 28 °C y se observó la formación de biofilm a las 15, 24 y 48 horas luego de inoculadas. Para observar la formación de biofilm las cuatro zonas fueron lavadas cuidadosamente con agua bidestilada estéril y secadas durante 20 minutos a 60 °C. Luego se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 45 minutos y posteriormente se lavaron tres veces con agua. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se tomaron fotos. La formación de biofilm fue evaluada visualmente a partir de la tinción violeta observada en cada caso.

Curva de crecimiento

Con el fin de evaluar la importancia de la formación de biofilm y la señalización por quórum sensing en el proceso de infección se realizaron curvas de crecimiento en hoja y en fruto para cepas mutantes con capacidad comprometida para estos procesos bacterianos. Se realizó la curva de crecimiento de Xcc: Δrpf incapaz de generar DSF y hacer señalización por quórum sensing y de dos cepas deficientes en la formación de biofilm: Xcc: $\Delta rfbC$ y Xcc $\Delta gumD$. Para ambos ensayos se utilizaron dos plantas huéspedes: naranjo Valenciano y pomelo Duncan.

En hoja

Se seleccionaron plantas jóvenes en el mismo estado de crecimiento (aproximadamente 10 semanas) con por lo menos tres hojas jóvenes cada una. Se eligieron cinco tiempos: cero, cuatro, siete, catorce y veintiún días post inoculación (dpi). Cada microorganismo fue suspendido en agua bidestilada estéril hasta una densidad óptica de 0,35 (aproximadamente 10×10^9 ufc/mL) y fue inoculado con un spray sobre toda la planta y en particular en ambos lados de la hoja. Para cada planta se utilizó un volumen aproximado de 15 mL de suspensión bacteriana. Las plantas fueron cubiertas con una bolsa plástica por 24 horas y mantenidas en el cuarto de plantas con humedad no menor que 80% y temperatura aproximada de 28 - 35 °C. Luego de 24 horas se retiró la bolsa

plástica. Para cada tiempo de lectura se tomaron dos hojas de plantas diferentes por cepa y de cada hoja se tomaron tres discos de 0,6 cm de diámetro. Estos discos fueron mezclados con 600 μL de agua bidestilada estéril y triturados con homogeneizador. A partir de esta suspensión inicial se realizaron diluciones seriadas y se tomaron tres gotas de 10 μL para ser plaqueadas. Como la cepa Xcc 306 es naturalmente resistente a rifampicina, este antibiótico se agregó a NA a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las placas fueron incubadas a 28° C por dos días y se contaron las colonias para cada dilución.

En fruto

Los frutos de este trabajo fueron recogidos de plantaciones dentro del Citrus Research and Education Center (CREC), Lake Alfred, Florida, Estados Unidos. Se eligieron frutos inmaduros de 2 a 3 cm de diámetro. Los frutos fueron lavados con agua corriente durante 10 minutos y luego sumergidos en etanol 70 % durante un minuto, el etanol remanente fue enjuagado tres veces con agua bidestilada estéril. Para secarlos antes de la inoculación se dejaron en la cámara de flujo laminar por dos horas. Para los ensayos en fruto se tomaron cuatro tiempos: cero, cuatro, siete y once días post inoculación.

Se inoculó una suspensión de cada microorganismo en agua bidestilada estéril en una densidad óptica final de 0,35 (aproximadamente 10×10^9 ufc/mL). Los frutos fueron agrupados de a veinte e inoculados con spray con aproximadamente 5 mL de suspensión. Luego de la inoculación se dejaron secar en la cámara de flujo. Los frutos inoculados fueron almacenados en cajas autoclavadas de 15 cm x 10 cm x 8 cm conteniendo 50 mL de agar-agua estéril y se incubaron a 28° C.

Se tomaron dos frutos por cada tiempo y para cada fruto se cortaron tres discos de 0,6 cm de diámetro. Cada disco fue triturado con homogeneizador y resuspendido en 600 μL de agua bidestilada estéril. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon tres gotas de 10 μL para cada dilución en NA con rifampicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las placas fueron incubadas a 28° C por dos días y se contaron las colonias para cada dilución.

Análisis de datos

Los datos obtenidos de las curva de crecimiento en hoja y fruto fueron calculados en unidades formadoras de colonia por unidad de área. A partir de estos datos se realizó un promedio por cada tiempo y se calculó el error estándar. Se realizó un test de T (MacExcel 2012) con un p valor de 0,05 y los datos que presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje fueron marcados con un asterisco.

Monitoreo del desarrollo de la enfermedad en fruto y en hoja

Se observó el efecto de la inoculación de Xcc, Xcc $\Delta r/bC$, Xcc $\Delta r/pF$ y Xcc $\Delta gumD$ en hojas y fruto de naranjo Valenciano y pomelo Duncan. En ambos casos se inoculó mediante spray una suspensión bacteriana en agua bidestilada de 0,35 de densidad óptica (10×10^9 cfu/mL) (ver Curva de crecimiento).

En fruto

Se monitoreó el desarrollo de la enfermedad hasta el día once post inoculación. Se fotografiaron los mismos frutos a los seis, nueve y once días post inoculación.

En hoja

Se monitoreó el desarrollo de síntomas y se tomaron fotografías a los catorce y veintiún días post inoculación.

Microscopía confocal laser de barrido

Se realizó microscopía confocal sobre muestras de fruto. Para este ensayo se utilizaron dos cepas fusionadas con GFP: Xcc - GFP y Xcc: $\Delta rpfF$ - GFP (deficiente en la producción de DSF). Se utilizó el Microscopio confocal laser de barrido (CLSM) modelo Leica TCS SL; Leica Microsystems GmbH, del Citrus Research and Education Center (CREC). Se colectaron frutos inmaduros de 2 a 3 cm de diámetro de naranjo Valenciano y pomelo Duncan y fueron lavados como se describe en Curva de crecimiento. Luego de secados en cámara de flujo, los frutos fueron inoculados en dos zonas diferentes con 20 μ L de suspensión bacteriana (con una densidad óptica total de 0,35) y fueron guardados en cajas autoclavadas de 15 cm x 10 cm x 8 cm conteniendo 50 mL de agar-agua estéril. Para este ensayo se escogieron los tiempos uno, cuatro, cinco y ocho días post inoculación para hacer las observaciones y se tomaron dos frutos por día en los cuales se cortó la superficie inoculada obteniendo no menos de diez preparados por fruto. Con el fin de evaluar la presencia de bacterias en el interior del fruto a los cuatro, cinco y ocho días post inoculación se realizaron preparados adicionales de cortes transversales a los discos obtenidos de la superficie de fruto. Los preparados fueron visualizados por el microscopio confocal laser de barrido y las imágenes tomadas fueron posteriormente analizadas.

Resultados

Búsqueda de candidatos para la inhibición de quorum sensing y formación de biofilm

Mínima concentración inhibitoria

Se probó la mínima concentración inhibitoria de los compuestos químicos candidatos a inhibir la formación de biofilm y/o la señalización por factores de quórum sensing. El objetivo fue encontrar una concentración subletal capaz de generar un efecto sobre alguno de estos procesos microbianos. La importancia de trabajar a concentraciones subletales radica en que de otra manera se generaría una alta presión selectiva sobre la población bacteriana lo que favorecería la generación de cepas resistentes a estos compuestos (en muchos casos antimicrobianos).

Para los donadores de óxido nítrico, los antibióticos y DSF se probó la toxicidad sobre Xcc hasta una concentración de 100 μ M, para los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos hasta 2,5 mM y para los D-aminoácidos 20 mM.

Algunos de los compuestos químicos utilizados (ver Tabla 4 y Tabla 5 en Materiales y métodos) son insolubles en agua, por lo que se utilizó acetona o DMSO como solvente para preparar la solución stock. Para observar el posible efecto de la acetona en la lectura se realizó un blanco con acetona y otro con agua bidestilada y medio de cultivo solamente. No se obtuvieron diferencias significativas en la lectura entre los diferentes blancos debido a la baja concentración final. En el gráfico se presentan solo los valores obtenidos con el blanco con el agregado de agua.

Se tomó como definición de mínima concentración inhibitoria (MIC, del inglés, minimum inhibitory concentration), aquella concentración de compuesto que resulta en la inhibición total del crecimiento bacteriano de Xcc en cultivo líquido estacionario luego de 48 hs.

Donadores de óxido nítrico

Para ninguno de los compuestos evaluados no se observó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de Xcc. En algunos casos, como 71778 y N3398 se ve incluso un pequeño aumento en la biomasa a altas concentraciones de compuesto químico. A partir de estos resultados se seleccionó la mayor concentración (100 μ M) para evaluar efectos sobre la formación de biofilm (Figura 12).

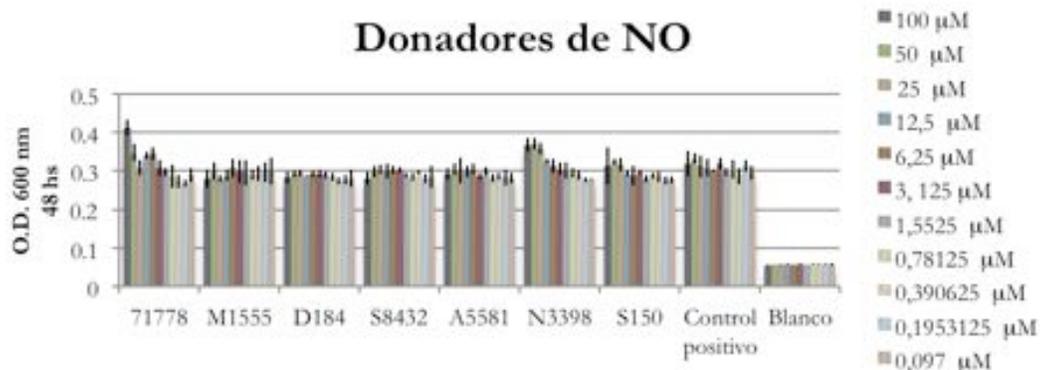


Figura 12 Mínima concentración inhibitoria, donadores de óxido nítrico.

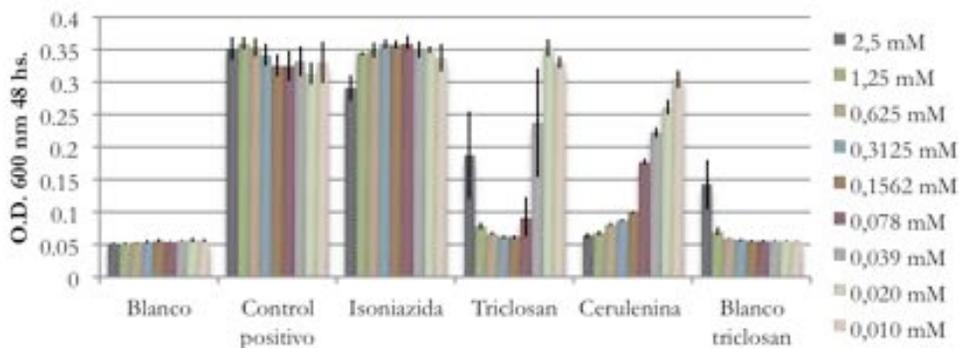
Antibióticos, DSF e inhibidores de la síntesis de ácidos grasos

Para el antibiótico sulfatiazol, no hubo mayor efecto en el crecimiento a las concentraciones probadas (de 100 - ~0,1 µM). En el caso de fluoruracilo, se ve un patrón de inhibición a mayores concentraciones de antibiótico. Sin embargo, incluso para la mayor concentración de fluoruracilo (100 µM) no hay inhibición total del crecimiento (Figura 13). A partir de estos resultados se seleccionó la concentración 100 µM para probar el efecto en la formación de biofilm para ambos antibióticos. Además, fluoruracilo fue también probado a dos concentraciones menores (50 y 25 µM).

La molécula señal de quórum sensing DSF no mostró efecto alguno sobre el crecimiento a concentraciones en el rango de 100 a ~0,1 µM (Figura 13). Para este compuesto también se seleccionó la mayor concentración probada para evaluar el efecto sobre la formación de biofilm (100 µM).

Los inhibidores de ácidos grasos tuvieron efectos inhibitorios más claros sobre el crecimiento bacteriano. Se logró determinar que la MIC para cerulenina es una concentración mayor a 0,16 mM y para triclosán mayor a 40 µM. Isoniazida no mostró efecto sobre el crecimiento por lo que se seleccionó la mayor concentración probada (2,5 mM) para ensayos posteriores (Figura 13).

Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos



Antibióticos y DSF

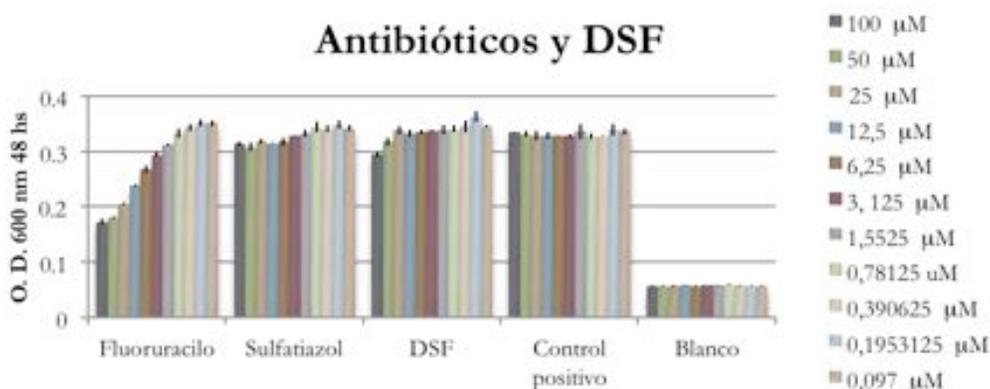


Figura 13 Mínima concentración inhibitoria de inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, antibióticos y DSF.

D - aminoácidos

Se probó el efecto inhibitorio del crecimiento de Xcc de seis D-aminoácidos (D-lisina, D-arginina, D-glutamina, D-glutamato, D-valina, y D-treonina). La MIC para D-lisina, D-arginina y D-glutamato se determinó como mayor a 10 mM. Para D-glutamina, D-valina y D-treonina el efecto tóxico en Xcc es menos severo y la MIC tiene un valor mayor a 20 mM (Figura 14). La mayor concentración determinada fue utilizada para evaluar el efecto sobre la formación de biofilm.

D - aminoácidos

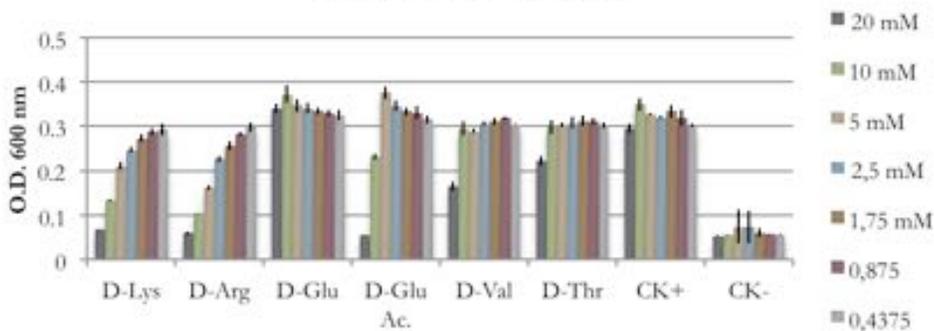


Figura 14 Mínima concentración inhibitoria, D-aminoácidos

Ensayo de formación de biofilm en superficie abiótica

Donadores de óxido nítrico

Se comprobó el efecto de los compuestos donadores de óxido nítrico sobre la formación de biofilm de Xcc en superficie abiótica (placas de poliestrieno, fondo liso, 96 pocillos) creciendo en medio rico (NB complementado con glucosa 2%) y medio mínimo (XVM2). Para todos los compuestos en ambos medios de cultivo se ve un decrecimiento significativo (test de t MacExcel 2012, con un p valor menor o igual a 0,05) de la absorbancia a 595 nm luego de la tinción con cristal violeta (Figura 15).

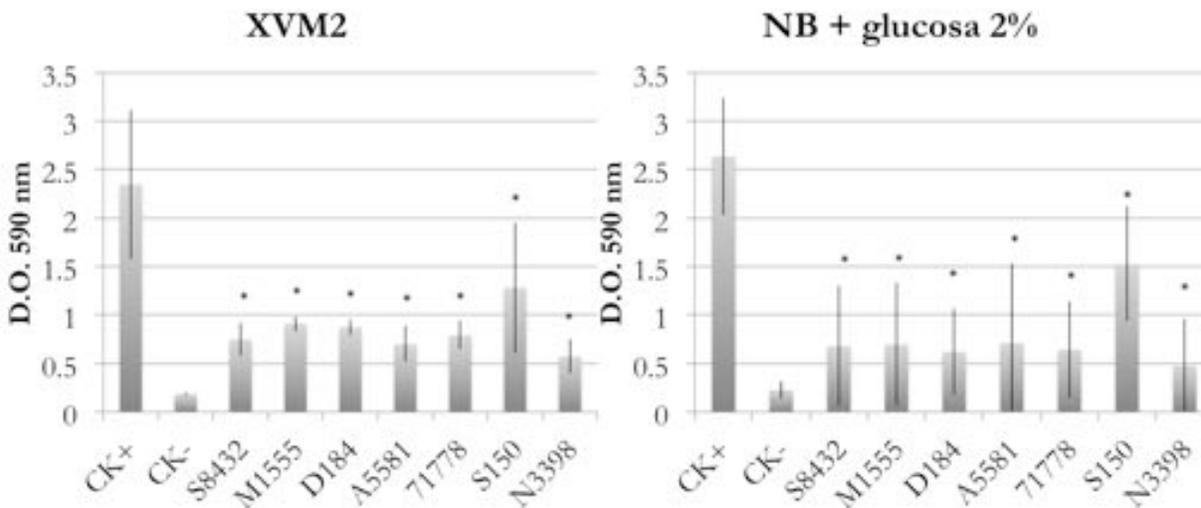


Figura 15 Efecto de los donadores de óxido nítrico en la formación de biofilm. Las barras de error muestran el desvío estándar y los asteriscos las diferencias significativas con el control (test de t, p menor o igual a 0,05).

Antibióticos y DSF

Sulfatiazol (S9876), DSF y fluoruracilo (F100) fueron probados a una concentración 100 μ M. A su vez, el antibiótico fluoruracilo fue empleado también a 50 y 25 μ M (F50 y F25 respectivamente). Para todos los casos hubo diferencias significativas en ambos medio de cultivo comparado con el control positivo sin agregado de compuestos. La única excepción es sulfatiazol en medio mínimo XVM2, donde no hay diferencias significativas (Figura 16).

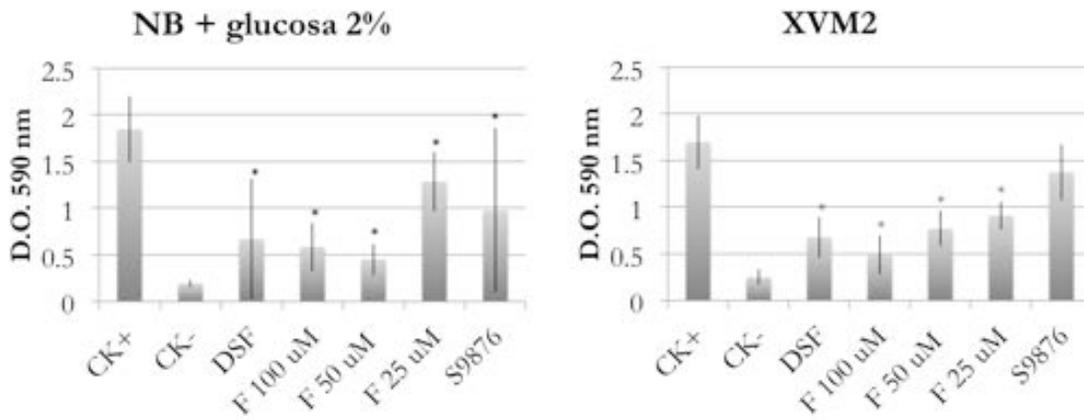


Figura 16 Efecto de antibióticos y DSF en la formación de biofilm. Las barras de error muestran el desvío estándar y los asteriscos las diferencias significativas con el control (test de t, p menor o igual a 0,05).

D-aminoácidos

En ambos medio de cultivo se observó un efecto significativo para cinco de los seis aminoácidos utilizados (D-treonina es el único treonina es el único aminoácido que no muestra un efecto significativo). Se observó también que D-arginina es el aminoácido que el aminoácido que muestra mayor efecto sobre la formación de biofilm en las condiciones probadas (Figura 17).

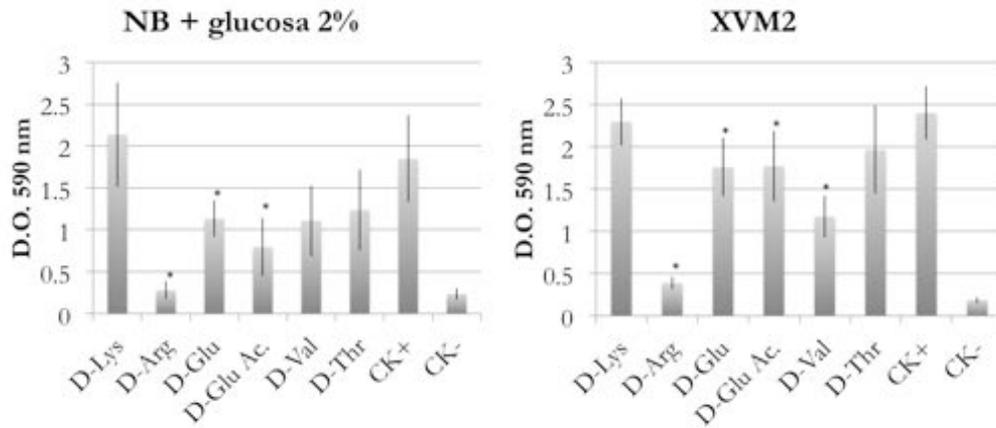


Figura 17

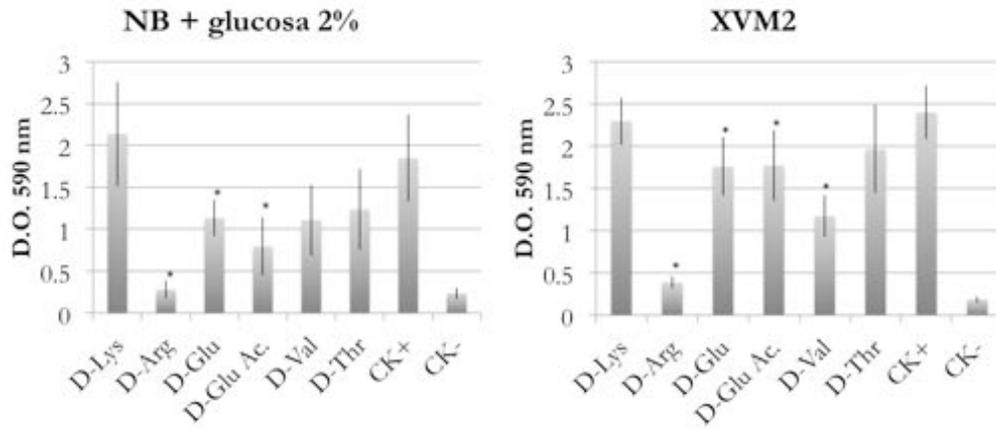
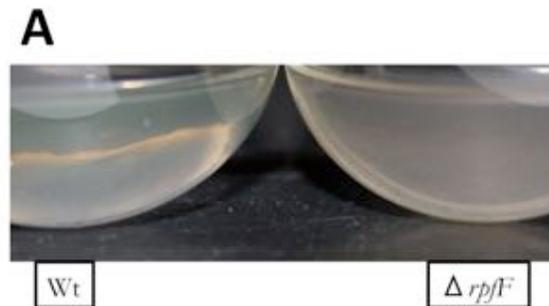


Figura 17 Efecto de D-aminoácidos en la formación de biofilm. Las barras de error muestran el desvío estándar y los asteriscos las diferencias significativas con el control (test de t, p menor o igual a 0,05).

Ensayo de fenotipo

El ensayo de fenotipo se basa en el hecho de que Xcc muestra diferente fenotipo cuando puede producir la molécula señal DSF y comparado a cuando no puede producir DSF. Esta observación proviene de los experimentos realizados por Dow y colaboradores en 2003, donde observaron este fenotipo en mutantes deficientes en el gen *rpfF*, el cual codifica una proteína con similitud a una enoil sintasa, y ha sido reportado como necesario para la síntesis de DSF (Dow et al., 2003). El ensayo fue realizado en medio mínimo ya que el efecto se puede observar mejor. En medio líquido y creciendo en condiciones de agitación Xcc $\Delta rpfF$, la cepa deficiente en sintetizar DSF, crece formando agregados celulares (Figura 18, A), estos se ven dispersos en el medio de cultivo, en contraste con la turbidez homogénea de la cepa salvaje.



B

Figura 18 Prueba de inhibidores de señalización por quórum sensing en ensayo de fenotipo. A) Fenotipo de la cepa salvaje (creciendo en forma dispersa) y la cepa *Xcc:ΔrpfF* (creciendo formando agregados) en medio XVM2 líquido y B) Efecto de los tres inhibidores de ácidos grasos en el fenotipo de *Xcc*.

En este ensayo se observó que el inhibidor de ácidos grasos triclosán a una concentración de 40 y 20 μM tiene la capacidad de cambiar el fenotipo de *Xcc* salvaje en medio XVM2 mostrando pequeños agregados celulares (Figura 18). Los resultados obtenidos en el cambio de fenotipo se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7 Ensayo de fenotipo.

Ensayo	Crecimiento	Agregados celulares
<i>Xcc</i> salvaje	++	-
<i>Xcc: ΔrpfF</i>	++	+
Cerulenina 0.039mM	+	-
Cerulenina 0.020mM	+	-
Cerulenina 0.010mM	++	-
Isoniazida 1.25 mM	++	-
Isoniazida 0.63 mM	++	-
Triclosán 0.040 mM	+	+
Triclosán 0.020 mM	+	+
Triclosán 0.010 mM	++	-

Crecimiento: ++ normal, + inhibición parcial

Agregados: + formación de agregados, - ningún agregado

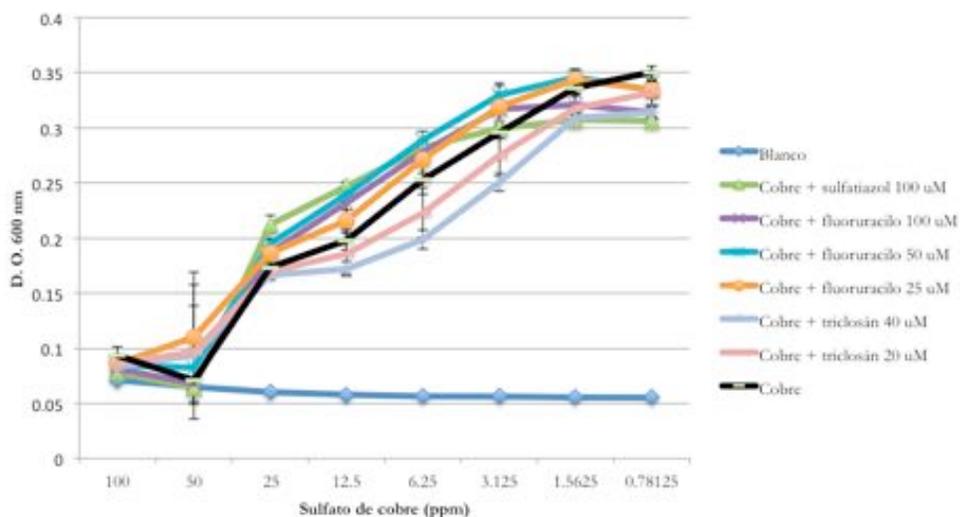
Mínima concentración inhibitoria en combinación con sulfato de cobre

Se determinó la MIC de catorce tratamientos con el objetivo de determinar una combinación compuesto inhibitorio-sulfato de cobre óptima para disminuir la eficiencia de infección de *Xcc* a concentraciones subinhibitorias. Para determinar la MIC se probó el efecto en el crecimiento de *Xcc* de catorce tratamientos distintos en conjunto con sulfato de cobre (en concentraciones de 100 – 0,8 ppm). Las catorce condiciones se

resumen en la Tabla 6 en Materiales y métodos. Para cada combinación se comprobó el efecto inhibitorio en comparación con el agregado de sulfato de cobre solo.

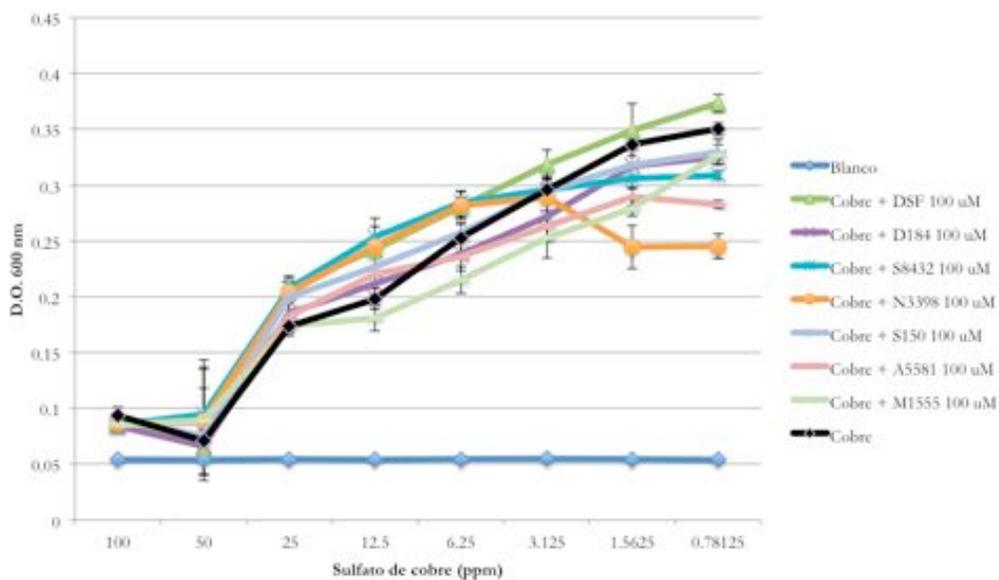
A

Antibióticos con sulfato de cobre



B

DSF y donadores de óxido nítrico con sulfato de cobre



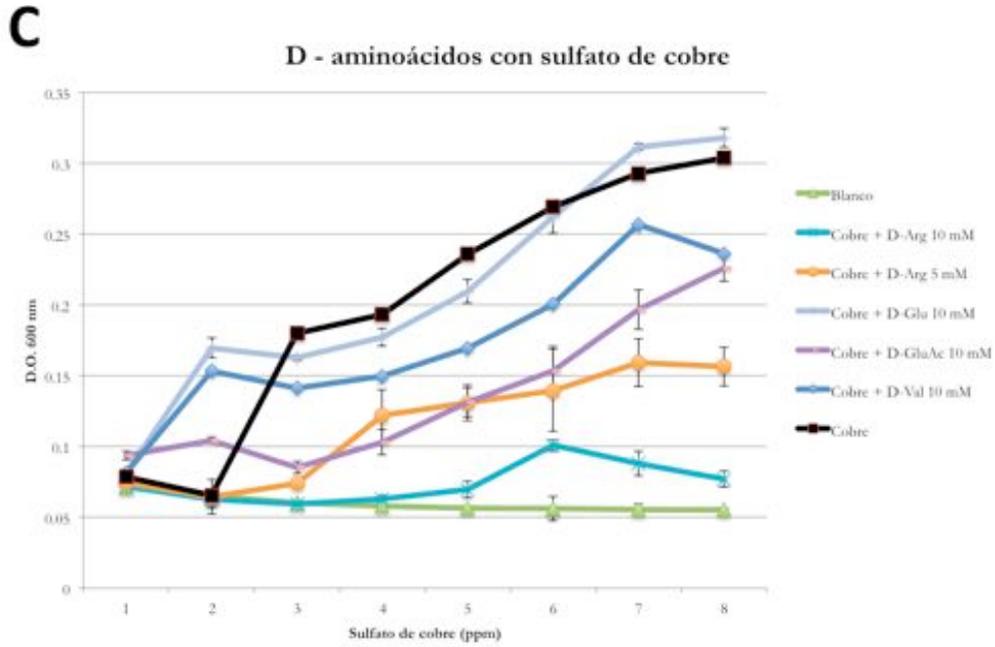
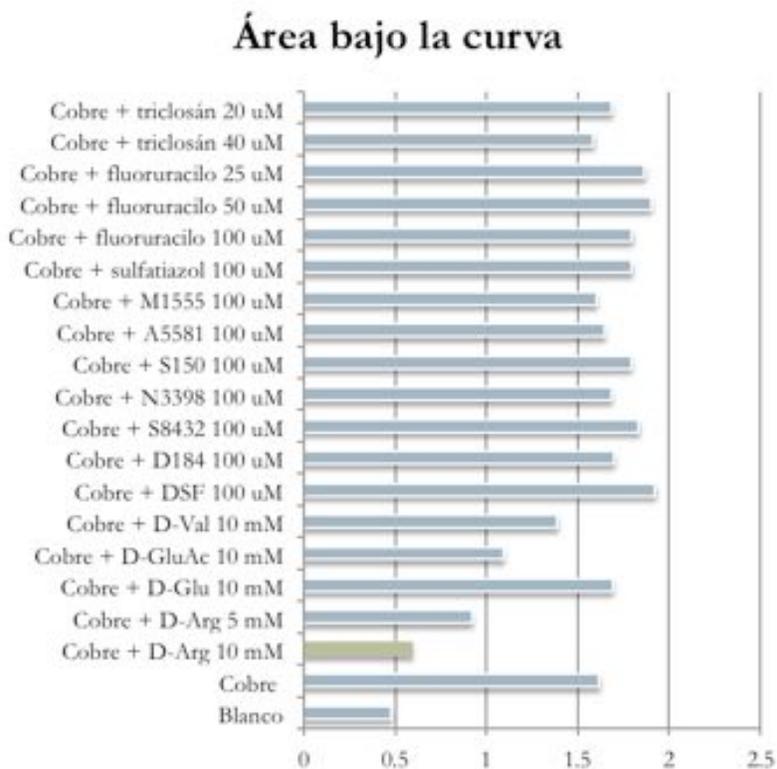


Figura 19 MIC de inhibidores en combinación con diferentes concentraciones de cobre. A) Antibióticos, B) DSF y donadores de óxido nítrico y C) D-aminoácidos.

Se seleccionó aquella combinación que produjera mayor efecto sobre el crecimiento de Xcc a partir del valor del área bajo la curva para cada gráfico. Se seleccionó D-Arginina 10 mM (identificada en celeste en la Figura 19, C) como el tratamiento a probar en los subsiguientes ensayos en planta. Arbitrariamente se seleccionó la concentración 25 ppm de sulfato de cobre para los siguientes ensayos, esta concentración es cuatro veces menor a la concentración utilizada en campo como control de la enfermedad.

Tabla 8 Eficiencia en la inhibición de crecimiento de Xcc.



1. Efecto de D-arginina y sulfato de cobre en el desarrollo de infección

Monitoreo del desarrollo de la enfermedad en fruto

Se probó el efecto del agregado de sulfato de cobre 25 ppm con el aminoácido D-arginina 10 mM en la infección en fruto (naranja valenciano). Se monitorearon los síntomas hasta los diez días post inoculación. En el tratamiento correspondiente a Xcc inoculado con 100 ppm de sulfato de cobre no se recuperaron colonias en ninguno de los recuentos realizados. Para Xcc inoculado con sulfato de cobre 25 ppm y D-arginina 10 mM algunas colonias se lograron recuperar a los tres días luego de la inoculación pero no se recuperaron colonias en los días subsiguientes. Sin embargo, la inoculación de Xcc sola en fruto de naranja valenciano muestra una curva de crecimiento similar a lo esperado (Figura 20, B). A pesar del lavado con etanol y la inoculación en cajas estériles, todos los frutos mostraron infección secundaria luego de ocho días por lo que los resultados en los síntomas pueden no ser representativos de la infección por Xcc (Figura 20, A).

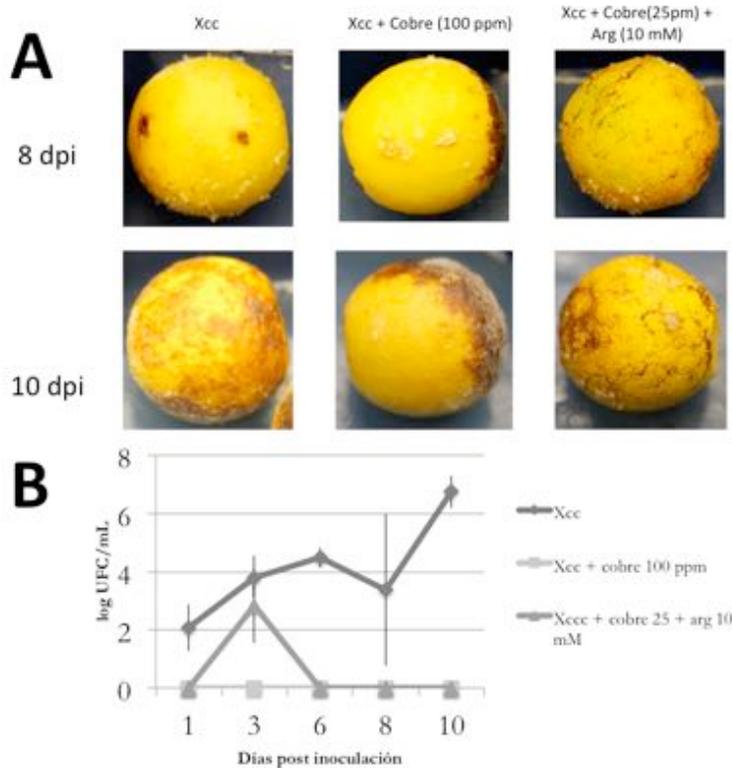


Figura 20 Efecto de D - arginina y sulfato de cobre en la infección de Xcc en fruto. A) Monitoreo del desarrollo de síntomas, B) Curva de crecimiento

Ensayo de formación de biofilm en superficies bióticas (hoja y fruto)

Se comprobó el efecto de la combinación de sulfato de cobre 25 ppm con D-arginina 10 mM sobre la formación de biofilm de Xcc en hoja y fruto. En fruto se observó el efecto de los tratamientos a las doce y veinticuatro horas, obteniéndose resultados similares. Para el control positivo de Xcc sin tratamiento, un halo violeta bien definido se puede ver luego de la inoculación con una gota. Sin embargo, en el tratamiento con sulfato de cobre y D-arginina se observa una tinción violeta más homogénea donde estaba inicialmente la gota. El control con agua no muestra coloración violeta (Figura 21).

En el ensayo en hoja se probó el efecto de la combinación de sulfato de cobre y D-arginina en hoja de pomelo Duncan y naranjo Valenciano para dos concentraciones de D-arginina diferentes (5 y 10 mM). Se determinó la formación de biofilm a las quince, veinticuatro y cuarenta y ocho horas obteniéndose resultados similares. En los tres casos se observó menor tinción violeta en el tratamiento con D-arginina 10 mM con respecto a 5 mM, mostrando que el efecto en la formación de biofilm depende de la concentración. El control correspondiente a Xcc inoculado sin tratamiento mostró en cada caso una menor superficie violeta en hoja.

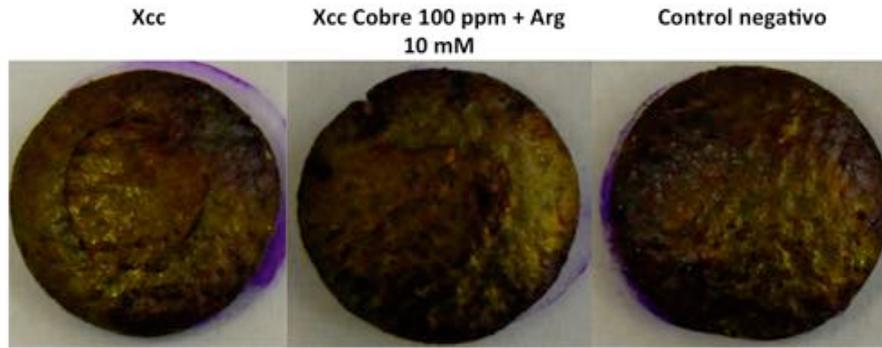


Figura 21 Ensayo de formación de biofilm en superficie biótica (fruto).

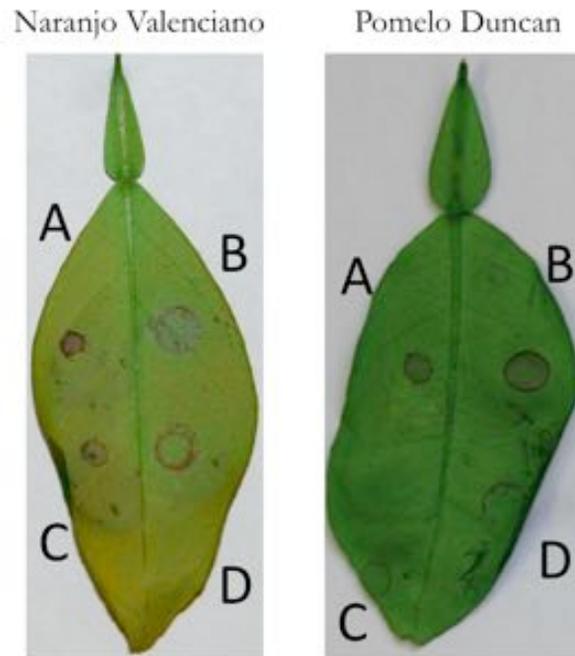


Figura 22 Ensayo de formación de biofilm en superficie biótica luego de 48 hs (hoja). A) Control con Xcc , B) Xcc en D-arg 5 mM, C) control con agua y D) Xcc con D-arg 10 mM

2. Rol de la formación de biofilm y la señalización por quórum sensing en la infección de Xcc

Se estudió el efecto de la capacidad de formación de biofilm señalización por quórum sensing de disminuir la efectividad de infección en cítricos de Xcc. Para este objetivo se seleccionaron cepas relevantes deficientes en genes implicados en estos dos procesos bacterianos. Se utilizaron plantas de naranjo Valenciano (variedad más resistente) y pomelo Duncan (variedad más susceptible) para ver los efectos en la infección de Xcc.

Monitoreo del desarrollo de la enfermedad en hoja

Curva de crecimiento y desarrollo de síntomas

Se monitoreó el desarrollo de síntomas en hoja de pomelo Duncan y naranjo Valenciano durante tres semanas luego de la inoculación por spray. En pomelo Duncan, se observaron algunas diferencias en el desarrollo de síntomas (menor aparición de lesiones necróticas) a los catorce días post inoculación en las plantas inoculadas con *Xcc:ΔrpfF* y *Xcc:ΔrbjC*, pero las diferencias no se mantuvieron a los veintiún días. A pesar de las diferencias cualitativas en el número de lesiones en la hoja, las curvas de crecimiento en hoja para pomelo Duncan no mostraron diferencias significativas entre la cepa salvaje y las tres mutantes (Figura 23 y Figura 25).

De forma similar, en naranjo Valenciano se observó menor aparición de lesiones necróticas a los catorce días post inoculación en las plantas inoculadas con *Xcc:ΔrpfF*, *Xcc:ΔgumD* y *Xcc:ΔrbjC*. A los veintiún días solo las plantas inoculadas con *Xcc:ΔrpfF* mostraban menor desarrollo de síntomas en las hojas (Figura 24 y Figura 25).

En las curvas de crecimiento realizadas en hojas se observaron diferencias significativas en las plantas inoculadas con *Xcc:ΔrpfF* con respecto a las inoculadas por la cepa salvaje a los cuatro días post inoculación y de *Xcc:ΔrpfF* a los veintún días post inoculación en pomelo Duncan (Figura 25). No se observaron diferencias significativas en la inoculación de las cepas mutantes con respecto a la salvaje en naranjo Valenciano.

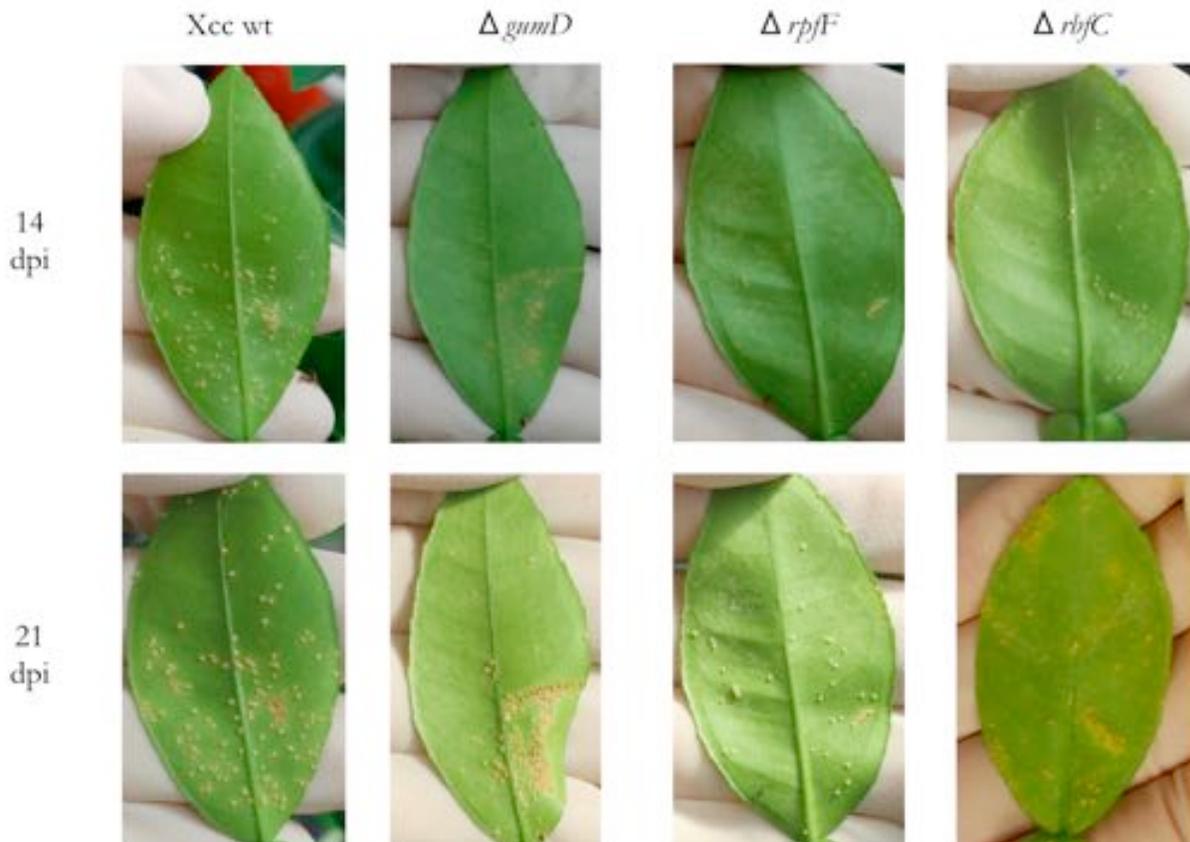


Figura 23 Monitoreo de síntomas en pomelo Duncan. Imágenes del desarrollo de lesiones en la superficie abaxial a los catorce y veintiún días post inoculación.

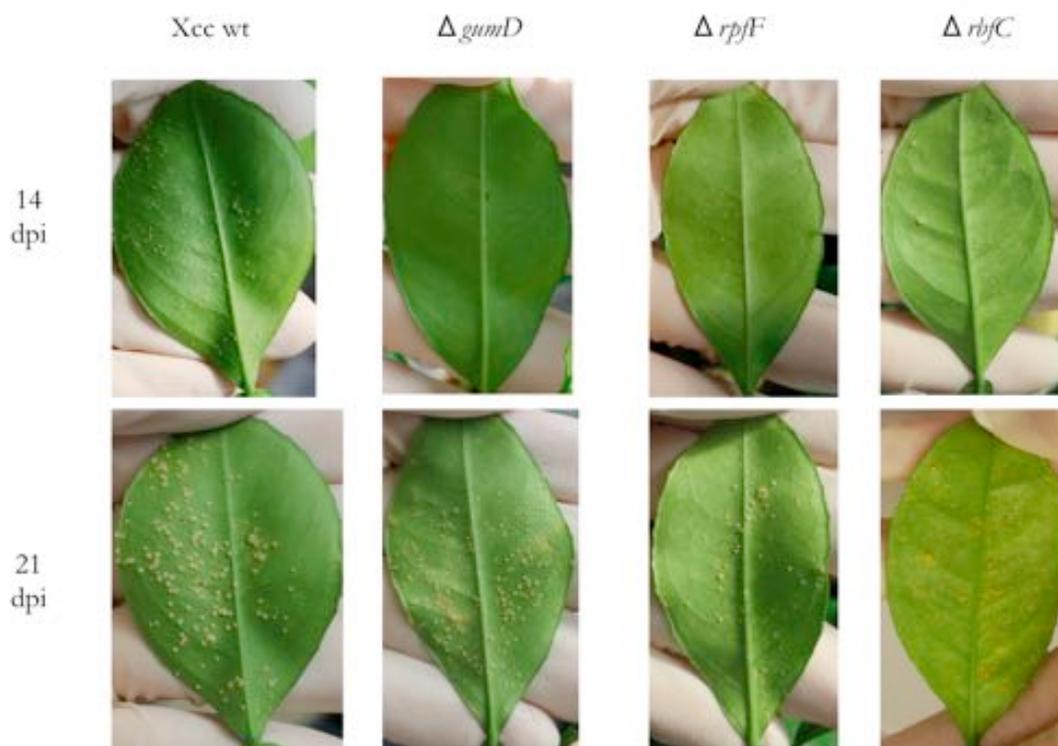
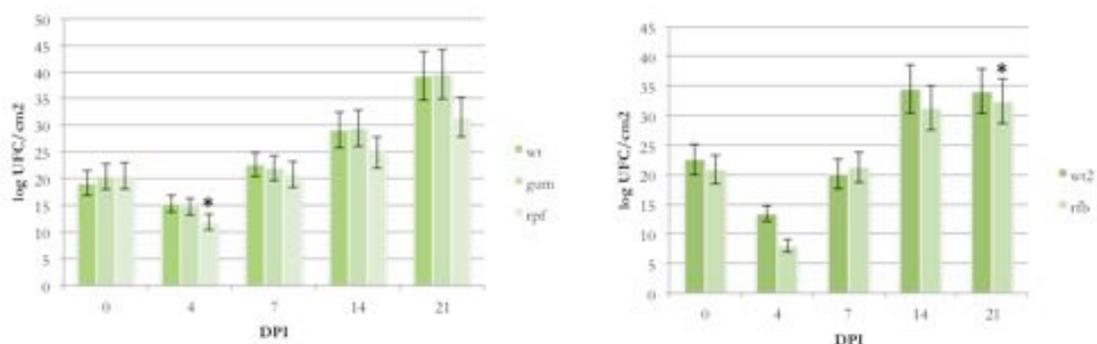


Figura 24 Monitoreo de síntomas en naranjo Valenciano. Imágenes del desarrollo de lesiones en la superficie abaxial a los catorce y veintiún días post inoculación.

Pomelo Duncan



Naranja Valenciano

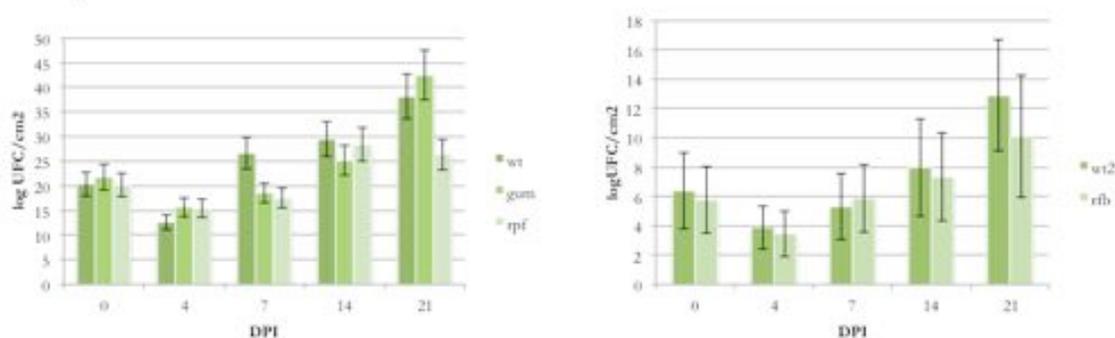


Figura 25 Curva de crecimiento en hoja para pomelo Duncan y naranjo Valenciano. Las barras de error representan el error estándar y los asteriscos muestran $p \leq 0,05$ en test de T.

Monitoreo del desarrollo de la enfermedad en fruto

Para este objetivo se siguió el mismo procedimiento que en la inoculación en hoja pero se seleccionaron diferentes tiempos para la curva de crecimiento debido a que los frutos fueron extraídos del árbol para el ensayo y no pudieron ser almacenados durante veintidós días por las contaminaciones secundarias por hongos.

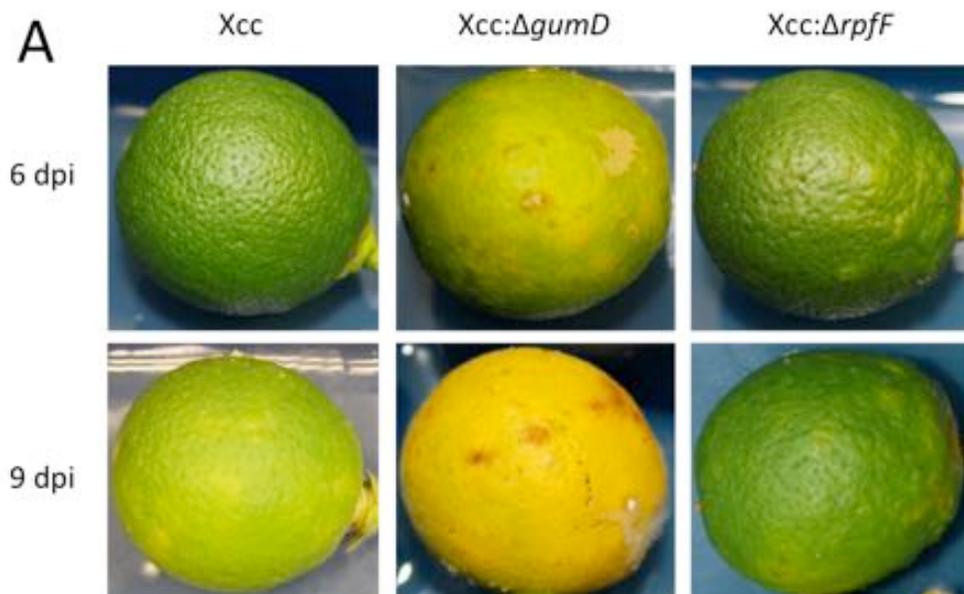
Curva de crecimiento y desarrollo de síntomas en pomelo Duncan

El seguimiento del desarrollo de síntomas en fruto se vio dificultado por la contaminación con hongos al ser almacenados en incubadora durante más de una semana. A pesar de las condiciones del fruto, se recuperaron colonias en placas de NB con rifampicina y se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes tanto para naranjo Valenciano como para pomelo Duncan.

En las curvas de crecimiento se observaron diferencias significativas en los frutos inoculados con *Xcc:ΔrpfF* a los cuatro y siete días post inoculación en naranjo Valenciano. También se observaron diferencias en los frutos inoculados con *Xcc:ΔgumD* a los cuatro y once días post inoculación en pomelo Duncan, aunque estas diferencias también se ven en el día cero, por lo que pueden deberse a una menor inoculación inicial. En pomelo, se recuperaron también menos colonias en los frutos inoculados con *Xcc:ΔrpfC* con respecto a la cepa salvaje a los siete días post inoculación (Figura 26, B y Figura 27).

Curva de crecimiento y desarrollo de síntomas en naranjo valenciano

Se observó menor población bacteriana a los cuatro y siete días post inoculación para la cepa mutante *Xcc:ΔrpfF*. A los once días post inoculación se logró recuperar también menor cantidad de esta bacteria aunque sin diferencias significativas. Para la cepa *Xcc:ΔgumD* también se observó una población bacteriana ligeramente menor comparada con la cepa salvaje, aunque solo se ven diferencias estadísticas en el día siete post inoculación. Estas cepas mostraron síntomas similares en la superficie de fruto durante el tiempo que se monitorearon en el experimento hasta los once días post inoculación (Figura 27). La infección secundaria de hongos en los once días post inoculación fue alta, imposibilitando ver el desarrollo de lesiones de cancro características (Figura 26, A). La cepa mutante *Xcc:ΔrpfC* no mostró grandes diferencias en comparación con la cepa salvaje *Xcc* (Figura 27).



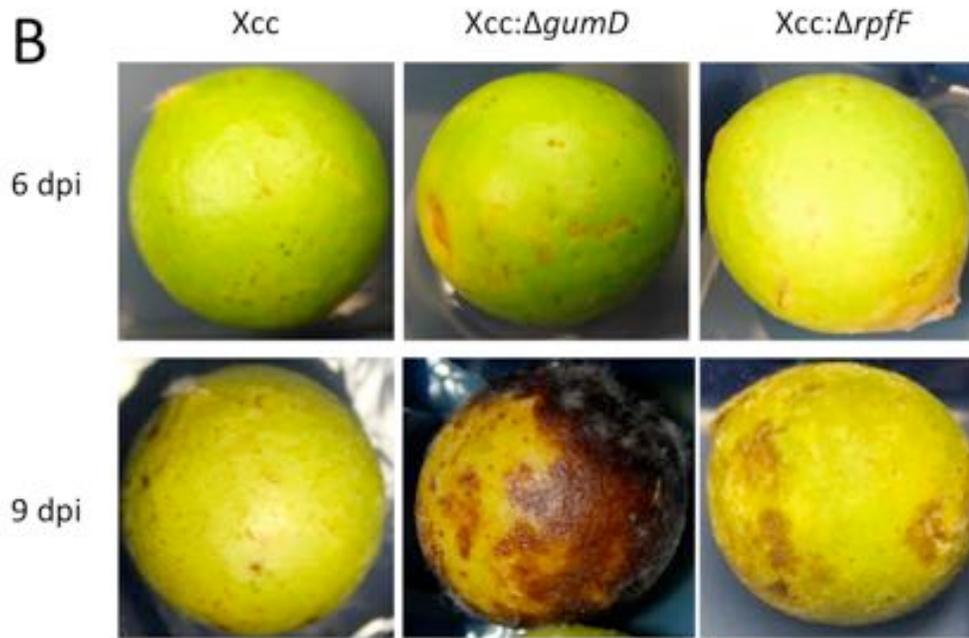


Figura 26 Monitoreo del desarrollo de la enfermedad en fruto. Imágenes de frutos A) naranjo Valenciano y B) pomelo Duncan luego de seis y nueve días post inoculación.

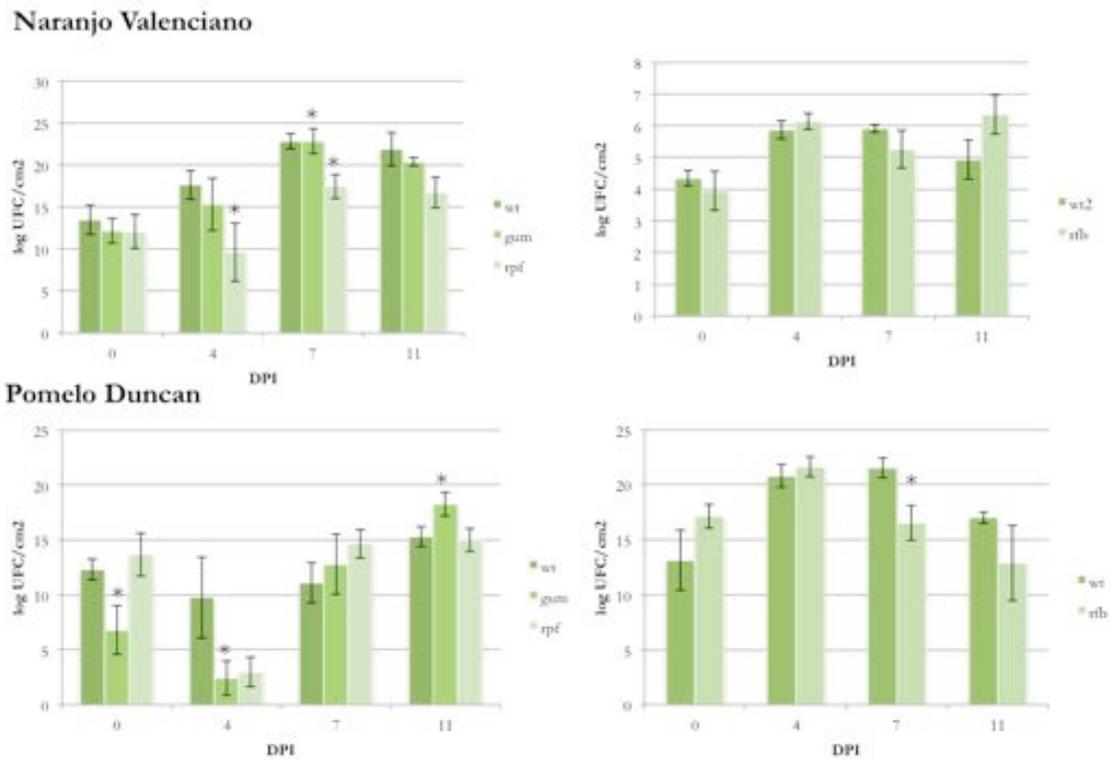


Figura 27 Curva de crecimiento en fruto. Las barras de error representan el error estándar y los asteriscos muestran $p \leq 0,05$ en test de T

u

Microscopía confocal laser de barrido en fruto

Se comparó el proceso de infección de Xcc cepa salvaje con $Xcc:\Delta rpfF$ (deficiente en la producción de DSF). Para la visualización con microscopía confocal se utilizaron dos cepas transformadas con el plásmido pUFZ75 conteniendo el gen GFP (Guo et al., 2012). En este estudio realizado previamente en el laboratorio, se estudió el efecto de la adición del plásmido en la capacidad de infección y supervivencia en planta de ambas cepas y no se encontró ninguna diferencia entre la cepa Xcc salvaje y la cepa mutante $Xcc:\Delta rpfF$. En el trabajo de Guo y colaboradores (2012) se estudió el proceso de infección en hoja y aquí se buscó observar los efectos en la capacidad de infección en fruto. Para ello, se inocularon frutos con ambas cepas y se visualizó la superficie del fruto a diferentes tiempos para dos variedades de cítricos: naranjo Valenciano y pomelo Duncan.

A partir de un análisis cualitativo de todas las muestras preparadas se observó mayor cantidad de bacterias rodeando la superficie de pomelo comparado con naranjo para ambas cepas (Figura 28) lo que es coherente con el hecho de que naranjo es una variedad más resistente a Xcc. Para este análisis se tomaron fotos de tres zonas inoculadas con bacteria (inoculación por gota, ver materiales y métodos) en dos frutos distintos. En el análisis de estas imágenes se observó que mientras que tanto Xcc -GFP como $Xcc:\Delta rpfF$ -GFP parecen no sobrevivir en la superficie de naranjo a los ocho días post inoculación, sí logran sobrevivir en superficie de pomelo luego de una semana.

En pomelo Duncan inoculado con $Xcc:\Delta rpfF$ -GFP no se observaron bacterias asociadas a los estomas de la planta en todas las imágenes obtenidas hasta el día ocho post inoculación. En contraste, para la cepa salvaje se encontraron algunas a los dos días (datos no mostrados) y en mayor cantidad a los cinco y ocho días post inoculación (Figura 28).

Se observaron también las secciones transversales de los discos obtenidos de la superficie de ambas variedades. Al igual que se observa en la superficie, no se logran recuperar bacterias con fluorescencia en los preparados de naranjo valenciano a los ocho días post inoculación pero sí se observan en pomelo Duncan (Figura 29). En los cortes realizados en pomelo y en naranjo se observó menor cantidad de bacterias adheridas a la superficie para los frutos inoculados con $Xcc:\Delta rpfF$ -GFP con respecto a Xcc -GFP. En todos los preparados e imágenes obtenidas se observaron resultados similares (Figura 29).

Se observó también a la cepa salvaje Xcc -GFP asociada a estomas de planta en pomelo a los ocho días post inoculación. En contraste, de los frutos inoculados con la cepa $Xcc:\Delta rpfF$ -GFP no se lograron ver bacterias asociadas a los estomas de la planta.

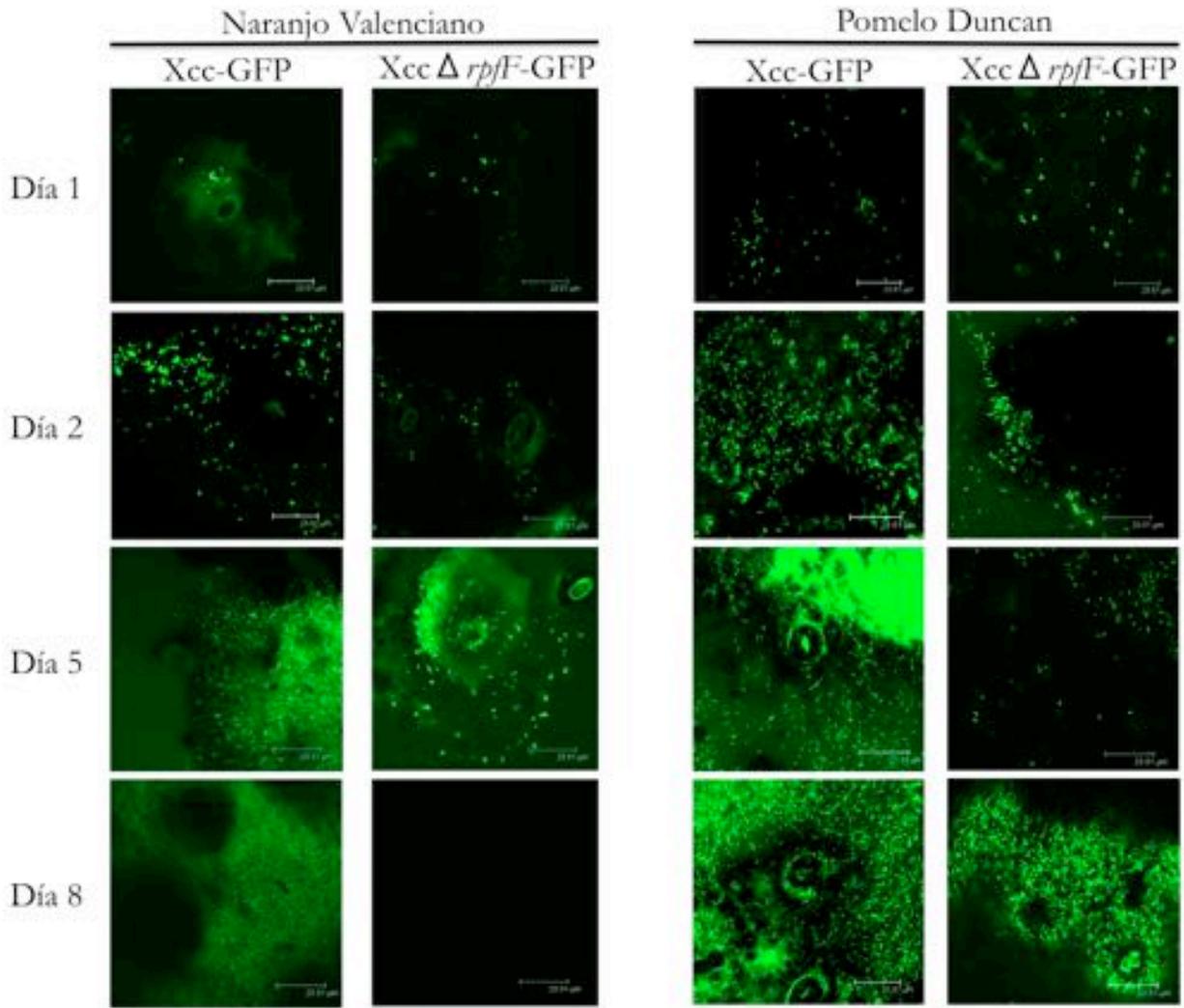


Figura 28 Microscopía confocal de la superficie de naranja Valenciano y pomelo Duncan.

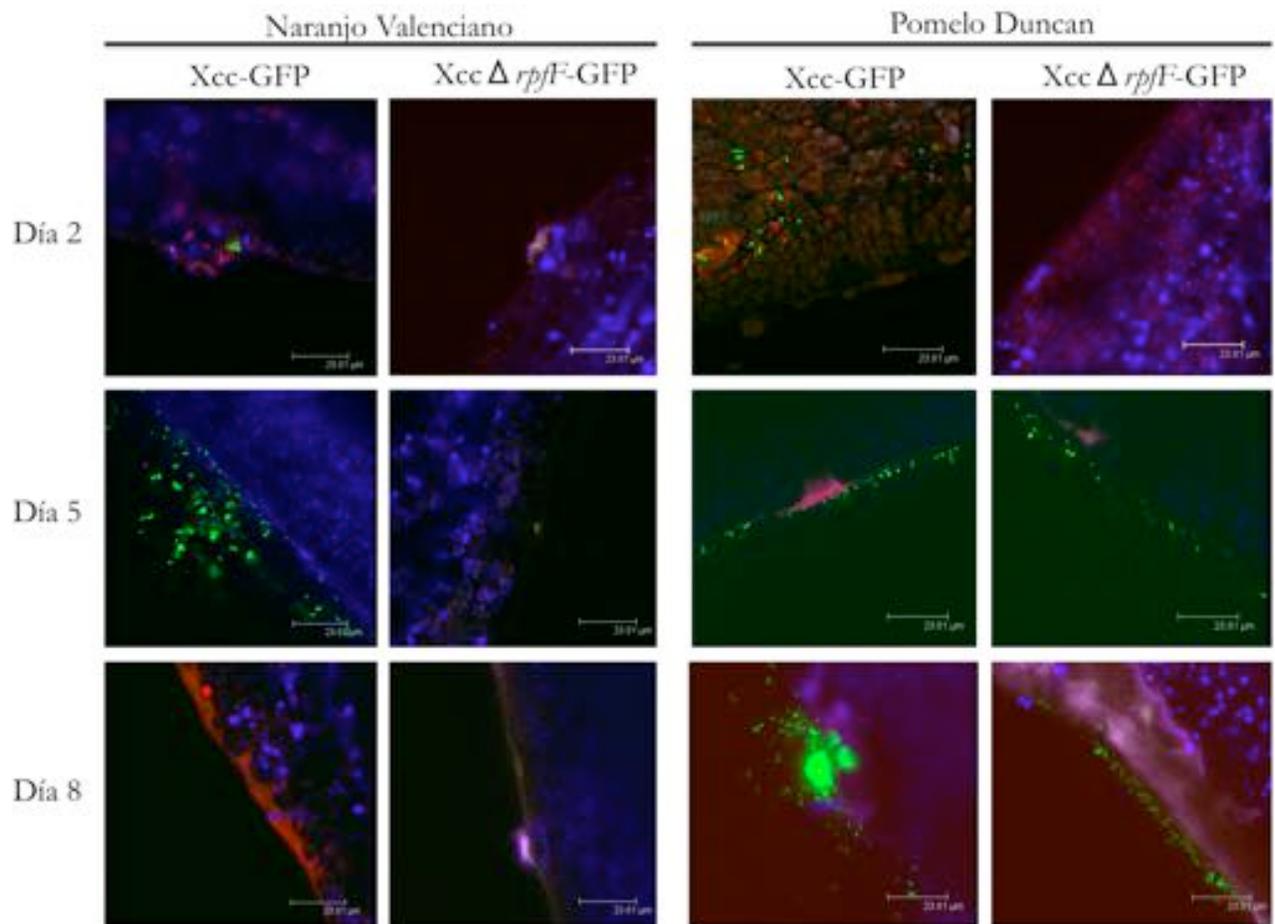


Figura 29 Microscopía confocal laser de sección transversal de superficie de naranja Valenciano y pomelo Duncan.

Discusión

- **Búsqueda de inhibidores**

Mínima concentración inhibitoria

El efecto tóxico de cada uno de los compuestos utilizados para los ensayos de biofilm, y quórum sensing fue probado en Xcc para observar los efectos negativos sobre el crecimiento bacteriano con el fin de determinar un rango de concentraciones subletales para ser usado posteriormente.

Donadores de óxido nítrico

En este trabajo se observó que no hubo efecto en el crecimiento bacteriano sobre Xcc causado por los donadores de óxido nítrico en ninguna de las concentraciones evaluadas (hasta 100 μM) e incluso para algunos casos se nota un aumento en la biomasa bacteriana (para los compuestos N3398 y 71778). Se tomó hasta una concentración de 100 μM . Esta concentración fue reportada para nitroprusiato de sodio (SNP), otro donador de óxido nítrico usado en *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración nunca mayor a 100 μM (Barraud et al., 2009). En los trabajos de Privett y colaboradores se determina que la mínima concentración inhibitoria de óxido nítrico para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* se encuentra entre 3.13 y 6.25 mg/mL (Privett et al., 2010). Sin embargo, a mayores concentraciones (mM) el efecto antibacteriano de algunos donadores de óxido nítrico ha sido reportado anteriormente, y poco se sabe de los mecanismos de resistencia involucrados. Algunas bacterias tienen la capacidad de aumentar la expresión de “scavengers” de óxido nítrico. La producción de reductasas o superóxido dismutasas puede ser utilizada por algunos grupos bacterianos para reducir la toxicidad del óxido nítrico y otros radicales libres (Privett et al., 2012). Sin embargo, a estas altas concentraciones se cree que la resistencia al óxido nítrico en bacterias es muy difícil, ya que por su naturaleza hidrofóbica y su pequeño tamaño, esta molécula tiene la capacidad de penetrar la membrana y reaccionar dentro del interior celular frente a diferentes blancos.

DSF

Para la molécula DSF se ve un leve efecto en el crecimiento a altas concentraciones del compuesto (100 μM) pero sin grandes diferencias con el control positivo. En trabajos previos, se probó el efecto de DSF purificado del sobrenadante de cultivo líquido de *Xanthomonas campestris* y el producido en forma sintética, sin tener ninguno efecto en el crecimiento (Dow et al., 2003). *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo), la bacteria responsable de la enfermedad del tizón¹, tiene un mecanismo de regulación y síntesis de DSF similar a Xcc. Dentro de este mecanismo *ryjC* codifica para una proteína responsable de sensar DSF. En 2010, He y colaboradores

¹ Enfermedad del tizón, en inglés bacterial blight disease.

reportaron que la cepa Xoo: $\Delta rpfC$ puede crecer en forma normal a pesar de producir veinticinco veces más DSF que la cepa parental (He et al., 2006b).

Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos

Los inhibidores de ácidos grasos mostraron diferentes efectos en el crecimiento de Xcc. Utilizando isoniazida, no se observaron efectos significativos sobre el crecimiento a las concentraciones probadas. Este compuesto ha sido reportado como inhibidor de la enzima 3-oxoacil-ACP reductasa, importante en la biosíntesis de ácidos micólicos y se emplea como agente antimicrobiano para el tratamiento de micobacterias, que utilizan el ácido micólico como componente de la pared celular. Sin embargo, triclosán y cerulenina que son utilizados como antimicrobianos de amplio espectro, sí tuvieron efecto sobre el crecimiento de Xcc en concentraciones en el rango de 2.5 mM a 0,039 mM. Estos compuestos han sido reportados como inhibidores de ACP reductasa y 3-oxoacil-ACP sintasa, respectivamente (Buttke and Ingram, 1978; Campbell and Cronan, 2001). La enzima 3-oxoacil-ACP sintasa es importante para la síntesis de ácidos grasos tanto saturados como insaturados.

Antibióticos

Para los antibióticos fluoruracilo y sulfatiazol se observó efecto en el crecimiento de Xcc a altas concentraciones (de 100 y 50 μ M). En particular el antibiótico flururacilo parece tener mayor efecto sobre el crecimiento de Xcc. En reportes previos en *E. coli*, se ha visto que fluoruracilo puede inhibir AriR, un regulador importante en la resistencia a ácidos. La cepa estudiada en este trabajo no tiene en su genoma ningún homólogo al gen AriR de *E. coli* por lo que posiblemente fluoruracilo tenga diferentes mecanismos de acción.

D-aminoácidos

Si bien se han reportado D-aminoácidos que pueden ser utilizados como nutrientes para mejorar el crecimiento bacteriano (Chang and Adams, 1974; Conrad et al., 1974), la adición de D-aminoácidos también ha mostrado tener efectos inhibitorios del crecimiento (Caparrós et al., 1991, 1992; Hammes, 1978). Este último fenómeno normalmente se atribuye a la capacidad de estas moléculas de alterar el metabolismo del peptidoglicano bacteriano, fundamental para la flexibilidad y plasticidad celular. Los D-aminoácidos son fundamentales para el remodelamiento de la pared celular bacteriana (Cava et al., 2011).

Inhibición de la formación de biofilm

Muchas moléculas orgánicas pequeñas han sido propuestas como posibles inhibidores de la formación de biofilm o capaces de promover su desensamblaje. En el primer caso, las moléculas pueden interferir con la producción de exopolisacáridos y otros compuestos importantes en la formación de la matriz. En el segundo caso, se trata de moléculas señal que disparan el desensamblado de la matriz hacia un modo de vida libre. El ciclo de desensamblado es parte natural dentro de la vida del biofilm, ya que a medida que este madura los recursos se pueden ir haciendo más escasos y los productos de desecho, muchas veces tóxicos, se acumulan en la matriz (Oppenheimer-Shaanan et al., 2013).

Donadores de óxido nítrico

El óxido nítrico ha sido reportado como compuesto capaz de inhibir la formación de biofilm de bacterias (tanto Gram positivas como Gram negativas) y hongos. Algunos ejemplos de organismos donde se ha visto el efecto del agregado de óxido nítrico son *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella pneumophila*, *Shewanella woodyi*, *Pseudoalteromonas atlantica* y *Candida albicans* (Arora and Boon, 2012; Barraud et al., 2006, 2009; Carlson et al., 2010; Hetrick et al., 2009; Liu et al., 2012; Privett et al., 2010; Yarullina et al., 2013). También se ha reportado que la formación de óxido nítrico intracelular puede afectar la formación de biofilm. En *Lactobacillus plantarum*, el óxido nítrico puede ser sintetizado en forma endógena a partir de L-arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), y la inhibición en la formación de biofilm se puede ver mediante el agregado de L-arginina en el medio de cultivo. En *Azospirillum brasilense*, el óxido nítrico puede ser producido de forma endógena como producto del ciclo de denitrificación, influyendo en la formación de biofilm de forma dependiente de la concentración (Arruebarrena et al., 2013).

En el presente trabajo, seis donadores de óxido nítrico fueron utilizados como candidatos a inhibir la formación de biofilm (M1555, D184, A5581, 71778, S150 y N3398). Los seis donadores mostraron resultados similares en medio mínimo XVM2 y medio NB glucosa 2%, aunque en este último los datos obtenidos mostraron mayor dispersión. Además se utilizó Sulfo-NONOato disódico (S8432), sal normalmente usada como control negativo cuando se utilizan NONOatos como donadores de óxido nítrico. A pesar de tener un grupo NONOato, S8432 no es capaz de disociarse liberando óxido nítrico en solución ya que este compuesto libera óxido nitroso en condiciones fisiológicas (Balcerczyk et al., 2005). Sin embargo, en este trabajo se observó menor formación de biofilm con el agregado de S8432 tanto en medio XVM2 como en NB con glucosa 2%, lo cual sugiere que otros factores podrían estar afectando la formación de biofilm más allá de la formación de óxido nítrico. Para estudiar este problema en más detalle, y confirmar si el efecto observado es realmente por la formación de óxido nítrico en solución, se podría agregar un “scavenger” como 2 – fenil 4, 4, 5, 5, tetrametilimidazolina -1- oxil - 3- óxido (PTIO). De esta forma se degradaría el óxido nítrico formado por lo que se debería revertir el efecto en la inhibición de biofilm.

Recientemente muchos trabajos se han realizado para lograr entender los mecanismos involucrados en esta regulación de la formación de biofilm. Estudios en *L. plantarum*, *L. pneumophila* y *S. woodyi* muestran como los dominios H-NOX (del inglés, Heme Nitric Oxide/Oxygen) parecerían jugar un papel importante como hemoproteínas sensoras de los niveles de este radical libre (Carlson et al., 2010; Liu et al., 2012; Yarullina et al., 2013). Las proteínas que contienen el dominio H-NOX componen una familia muy extendida en bacterias y vertebrados (Plate and Marletta, 2012). En vertebrados, el sensado de óxido nítrico a través del dominio H-NOX normalmente involucra la actividad de enzimas solubles llamadas diguanilato ciclasas y la formación de GMP cíclico intracelular (Derbyshire and Marletta, 2009). En bacterias el mecanismo es menos conocido, pero también se ha visto que los dominios H-NOX en anaerobios facultativos se encuentran asociados a histidina quininas, proteínas con dominios GGDEF y EAL importantes para la regulación de GMP dicíclico (Carlson et al., 2010). En *P. atlantica*, se ha caracterizado un sistema de dos componentes que incluye un dominio sensor de

óxido nítrico con su correspondiente diguanilato ciclasa como dominio de respuesta (Arora and Boon, 2012). Los sistemas de dos componentes son importantes para la regulación del metabolismo bacteriano en respuesta a diferentes estímulos del ambiente. *Xanthomonas citri* subesp. *citri* tiene nueve proteínas con relativamente baja similitud con la superfamilia HNOB (del inglés, Heme Nitric Oxide Binding), estas son proteínas anotadas como transportadoras, sensoras redox, metiltransferasas y proteínas de secreción. Sería interesante profundizar en la función de estas y su posible rol en el sensado del óxido nítrico y la formación de biofilm.

Antibióticos

Los antibióticos utilizados, fluoruracilo y sulfatiazol, también mostraron disminución en la formación de biofilm tanto en medio mínimo XVM2 como en NB glucosa 2%. Sulfatiazol mostró tener menos efecto que fluoruracilo a las concentraciones ensayadas en ambos medios y los datos obtenidos con este antibiótico mostraron mayor dispersión. Para fluoruracilo que fue probado en tres concentraciones (100, 50 y 25 μ M), se observó un efecto en la formación de biofilm dependiente de la dosis utilizada en medio mínimo. Sin embargo, en NB glucosa 2% el efecto en la disminución de biofilm dependiente de la concentración no es tan claro, si bien se observó menor disminución para la menor concentración utilizada. Este compuesto ha sido reportado capaz de inhibir la formación de biofilm en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Attila et al., 2009; Ueda et al., 2009). El mecanismo por el cual ocurre esta inhibición es desconocido aunque en *E. coli* se ha observado que fluoruracilo es capaz de inducir la expresión de genes de estrés e inhibir genes de la biosíntesis de histidina (Attila et al., 2009). Para saber si mecanismos similares ocurren en Xcc sería interesante evaluar la expresión génica de genes de estrés y síntesis de histidina y monitorear el efecto con el agregado de fluoruracilo.

El mecanismo reportado hasta ahora por el cual sulfatiazol puede actuar sobre la formación de biofilm en *E. coli* es a través de la inhibición de enzimas diguanilato ciclasas interfiriendo en los niveles de GMP dicíclico intracelulares. Sería interesante evaluar qué ocurre con los niveles intracelulares de este segundo mensajero en Xcc ante el agregado de las concentraciones de sulfatiazol ensayadas y observar si existe un efecto. La concentración de este segundo mensajero ha sido monitoreada in vivo en *P. aeruginosa* (Barraud et al., 2009)b.

D-aminoácidos

De todos los compuestos utilizados, los D-aminoácidos fueron los que mostraron mayor inhibición en la formación de biofilm en Xcc. Durante mucho tiempo se creyó que los D-aminoácidos no tenían funciones biológicas relevantes, hoy en día se sabe de muchos procesos regulados por estos compuestos. En humanos D-aspartato es un importante regulador de la neurogénesis (Kim et al., 2010), D-serina actúa como coagonista de los receptores de N-metil-D-aspartato en el cerebro (Kleckner and Dingle, 1988; Wolosker, 2007; Wolosker et al., 2002) y este último aminoácido se encuentra también en la orina humana (Anfora et al., 2008). A su vez, en bacterias algunos D-aminoácidos forman péptidos implicados en mecanismos postraduccionales y formando NRPs (del inglés non-ribosomal peptides) que tienen diversas funciones biológicas en las células como antibióticos, sideróforos, quelantes, etc.. Muchas bacterias tienen la capacidad de sintetizar D-alanina y D-glutamato para formar la pared celular a partir de sus L-enantiómeros. Además, algunas bacterias sintetizan D-

metionina y D-leucina como metabolitos capaces de regular la pared celular durante la fase estacionaria de crecimiento y además causan dispersión de biofilm (Cava et al., 2011) ().

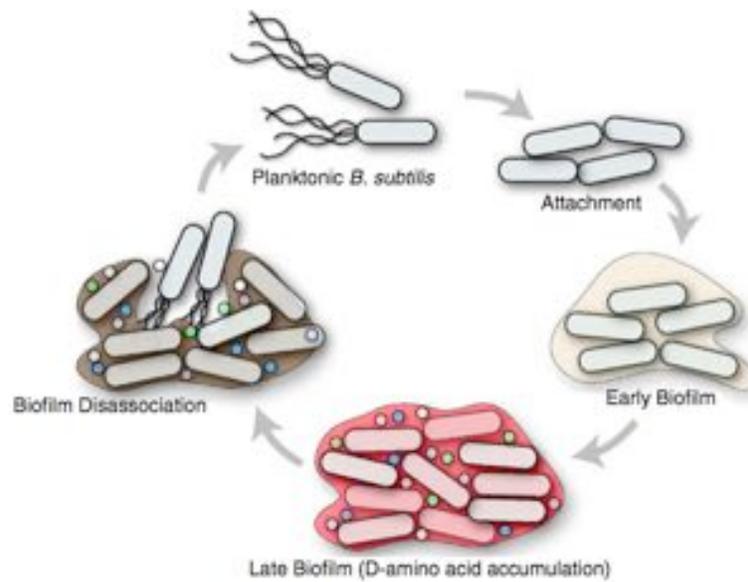


Figure 30 Rol de D-aminoácidos en el ciclo de formación de biofilm. Fuente: Cava et al 2011

En este trabajo se probó el efecto de seis D-aminoácidos en la formación de biofilm. Es interesante destacar que el efecto en la formación de biofilm no estuvo totalmente correlacionado con el efecto en la inhibición del crecimiento. Por ejemplo, para el aminoácido D-lisina, se observó un gran efecto en el crecimiento a una concentración 10 mM, pero no se observó un gran efecto en la formación de biofilm.

Se observó que el aminoácido D-arginina mostró más actividad inhibiendo la formación de biofilm en Xcc. En el futuro sería relevante estudiar si el mecanismo por el cual este inhibidor actúa sobre Xcc es mediante la disrupción de la pared celular. Para esto podrían emplearse técnicas microscópicas para determinar si existen cambios en la estructura de la pared celular frente al agregado de este compuesto.

Inhibición de la síntesis de señales de quorum sensing

Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos

Los tres candidatos probados como posibles inhibidores de la síntesis de DSF fueron triclosán, cerulenina e isoniazida, de los cuales solo los dos primeros tuvieron efecto sobre el crecimiento bacteriano. Si bien triclosán y cerulenina mostraron efectos sobre el crecimiento de Xcc, solo triclosán fue capaz de cambiar el fenotipo de Xcc en cultivo líquido.

Triclosán actúa sobre la enzima ACP reductasa. Dos enzimas caracterizadas con importantes roles en la síntesis de ácidos grasos insaturados en bacterias son TesA y TesB. La primera es una acil CoA tioestearasa del tipo I, hidrolasa importante en los pasos de elongación. Sin embargo, hasta ahora no se han encontrado homólogos de esta enzima en Xcc 306 (KEGG pathway database, enzima 3.2.1.1). El hecho de que triclosán y no cerulenina pueda cambiar el fenotipo de Xcc sugiere que estos dos compuestos pueden estar actuando sobre diferentes

enzimas o rutas metabólicas para la producción de ácidos grasos insaturados en Xcc. Sin embargo, la ruta completa de síntesis de DSF y las enzimas implicadas no han sido caracterizadas aun, por lo que sería necesario investigar más sobre los pasos en la síntesis de DSF para entender su síntesis y lograr inhibir su producción.

Triclosán es usado ampliamente como preservativo, agente antiséptico y desinfectante en una amplia gama de productos cotidianos como pasta de dientes, jabones, plásticos, etc (Tabak et al., 2007). Su mecanismo de acción antibacteriana es a través de la inhibición de la enzima NADH dependiente enoil-acil reductasa, FabI, enzima importante en la síntesis de ácidos grasos en *E. coli* (McMurry et al., 1998). Triclosán puede unirse al sitio activo de FabI formando un complejo inhibitorio ternario NAD(H)-enzima-triclosán (Levy et al., 1999). A altas concentraciones triclosán puede dañar la membrana celular, pero se sospecha que tiene más mecanismos de acción no definidos aun (Tabak et al., 2007). En *Xanthomonas oryzae* la enzima enoil-acil reductasa FabI cataliza el último paso en la reacción de elongación de los ácidos grasos y su estructura fue establecida recientemente (Li et al., 2011). Se ha reportado también que la isoniazida puede inhibir la actividad de FabI al unirse a esta y a NADH formando un complejo ternario (Li et al., 2011). Sin embargo, para las concentraciones ensayadas en este trabajo no hubo efecto de la isoniazida sobre el crecimiento bacteriano.

- **Efecto de sulfato de cobre con D-arginina en el proceso de infección y la formación de biofilm.**

La combinación D-arginina con sulfato de cobre fue seleccionada para estudiar su efecto en el proceso de infección y en la capacidad de inhibir la formación de biofilm.

Proceso de infección

Para evaluar el efecto en el proceso de infección se realizó una curva de crecimiento en frutos de naranjo Valenciano. Los resultados muestran que la población de Xcc es similar al control a los tres días post inoculación pero parece decaer drásticamente a los seis, ocho y diez días donde no se recuperan colonias. Por un lado estos resultados sugieren que la combinación es prometedora para disminuir la infección de Xcc en planta. Sin embargo, es importante notar que no se logran recuperar colonias en el día cero post inoculación. Si bien la combinación de compuestos altera el crecimiento bacteriano a pesar de estar por debajo de la concentración mínima inhibitoria, se esperaría poder recuperar colonias en el día cero. Esto puede deberse que en el conteo en el día tres post inoculación, las colonias contadas no fueran realmente Xcc sino otra bacteria de similar morfología resistente a rifampicina. Si tal fuera el caso, los resultados no estarían representando con fidelidad la dinámica de población de Xcc en fruto para cada tratamiento. Para disminuir el margen de error y el problema de la especificidad, se podría utilizar otra metodología para realizar la curva de crecimiento. Recientemente, primers específicos para Xcc 306 han sido diseñados para amplificar el gen *pthA* (Cubero and Graham, 2005). Para trabajos futuros, el proceso de infección podría ser evaluado en planta en lugar de fruto utilizando conteo en placa y PCR en tiempo real y comparar ambos resultados.

Formación de biofilm en hojas y fruto

El efecto de la combinación de D-arginina con sulfato de cobre en la superficie de hojas y fruto fue seleccionado y probado. En ambos casos se observó macroscópicamente una disminución en la tinción con cristal violeta con respecto a la cepa control, lo que sugiere que la combinación de compuestos es efectiva inhibiendo la formación de biofilm.

El efecto inhibitorio en la superficie de hoja tanto de naranjo Valenciano como pomelo Duncan se observa claramente a las 48 horas post inoculación, aunque los efectos también se pueden ver antes (no se muestran fotos). Además, para ambas variedades de cítricos se observa que la disminución en la formación de biofilm es dependiente de la concentración de D-arginina utilizada, resaltando la importancia de este compuesto en el efecto observado. En superficie de fruto los efectos no son tan claros debido a la dificultad de tinción de los discos cortados.

En un futuro sería interesante estudiar el efecto en la formación de biofilm de D-arginina y compararlo con el efecto de la combinación con sulfato de cobre. De esta forma se podría observar si el D-aminoácido solo tiene la capacidad de afectar la formación de biofilm en Xcc, o aumentar el proceso de dispersión. Además se podría estudiar el efecto de la combinación en superficies abióticas.

- **Rol de la formación de biofilm y quorum sensing en el proceso de infección de Xcc**

La formación de biofilm y el proceso de infección

Parte del ciclo de la enfermedad del cancro incluye la dispersión de Xcc y su contacto con el tejido vegetal. Durante estas primeras etapas de infección, la capacidad de formar biofilms en la superficie de hojas, frutos y tallos contribuye por lo menos en parte a la sobrevivencia bacteriana antes de que el patógeno ingrese por los estomas o heridas. En esta parte del trabajo, se buscó ver el efecto en la infección y el desarrollo de la enfermedad del cancro de cepas deficientes en genes previamente reportados como implicados en la formación de biofilm (*gumD*, *rfbC*) o en la señalización por factores de quórum sensing (*tpfF*) (Li and Wang, 2011c). Estos genes fueron identificados como importantes en la formación de biofilm de Xcc, pero hasta ahora su funcionalidad no había sido caracterizada *in planta*.

El gen *gumD* se encuentra dentro del operón gum, el cual en conjunto permite la síntesis y exportación de xantano ((Dunger et al., 2007; Rigano et al., 2007b). Además de los exopolisacáridos (EPS) como xantano, algunos lipopolisacáridos (LPS) también juegan un papel en la formación de la matriz que forma el biofilm. El gen *rfbC*, al igual que *wxaO* han sido anotados como relevantes en la biosíntesis de LPS. En las curvas de crecimiento en hoja se observó una diferencia en el número de colonias recuperadas de Xcc: Δ *tpfF* con respecto al control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de colonias recuperadas de Xcc: Δ *rfbC* y Xcc: Δ *gumD*. Por otro lado, en el recuento en fruto se ven algunas diferencias a los cuatro y siete días post inoculación. Dado los datos obtenidos no se puede afirmar una diferencia notoria en el proceso de

infección solo por ser deficientes en estos genes. Esto puede deberse a que la formación de biofilm es un proceso metabólico complejo que involucra una gran cantidad de factores y Xcc puede estar complementando la deficiencia en estos genes por otras vías.

La cepa mutante *Xcc:Δ*rrpF**, incapaz de producir DSF, tiene impedida la señalización por quórum sensing mediante el sistema DSF. A su vez, la señalización por DSF afecta la formación de biofilm por lo que esta cepa tiene afectados ambos procesos bacterianos. A pesar de que solo se observaron diferencias significativas en el día cuatro post inoculación, *Xcc:Δ*rrpF** se recuperó en menor número para todos los tiempos monitoreados en comparación con la cepa salvaje.

Quorum sensing y el proceso de infección

La importancia de la señalización por quórum sensing en el proceso de infección se estudió utilizando la cepa deficiente en el gen *rrpF* y observando diferencias en la infección en fruto bajo microscopía confocal y a su vez estudiando la curva de crecimiento en planta (hoja y fruto).

La señalización por quórum sensing regula diferentes procesos del metabolismo de Xcc, muchos de los cuales son importantes en el proceso de infección. En particular, la señalización por quórum sensing regula a través de *rrpG* la concentración intracelular de GMP dicíclico, y por tanto la producción de enzimas extracelulares importantes en la adhesión, la motilidad y la formación de biofilm.

En las curvas de crecimiento en fruto de naranjo valenciano se observaron diferencias significativas a los cuatro y siete días post inoculación siendo la población de *Xcc:Δ*rrpF** menor a la de la cepa salvaje. Para pomelo Duncan, se observó menor población a los cuatro días tanto para hoja como para fruto aunque en este último caso no en forma significativa. En la microscopía confocal laser de barrido, se observa mayor cantidad de bacterias en la superficie de fruto de pomelo comparado con naranjo, lo que concuerda con el hecho de que la variedad pomelo Duncan es más susceptible.

Sin embargo, la comparación entre la curva de crecimiento en fruto y las imágenes obtenidas en microscopía confocal deben hacerse con cuidado ya que la forma de inoculación en cada caso fue diferente. En las curvas de crecimiento se buscó imitar la forma de dispersión natural de Xcc, aplicando una dispersión de bacterias en forma de spray mientras que para los ensayos de microscopía se aplicó una mayor concentración bacteriana en gota y se realizaron preparados directamente sobre la zona inoculada.

Para probar la importancia en la síntesis de DSF en el proceso de infección podría estudiarse la capacidad de formación de biofilm y la curva de crecimiento en planta utilizando el inhibidor triclosán a las concentraciones 20 o 40 μM . Este compuesto que mostró la capacidad de cambiar el fenotipo de Xcc en cultivo líquido parece un buen candidato a inhibir la formación de DSF. Sería interesante observar el efecto de la aplicación de combinaciones de este compuesto en la capacidad de infección y compararlo con los resultados obtenidos con la cepa mutante deficiente en el gen *rrpF*.

Conclusiones y perspectivas

La enfermedad del cancro en cítricos sigue siendo un gran problema a nivel mundial. Actualmente el control de la enfermedad se basa en el uso de formulaciones de cobre lo cual trae como consecuencia la generación de cepas resistentes y daños en el ambiente. La bacteria causante de la enfermedad se dispersa por la acción del hombre y las lluvias colonizando nuevas plantas huéspedes. La formación de biofilm como forma de adhesión a la superficie de hojas, tallos y frutos al igual que la comunicación por factores de quórum sensing son dos procesos bacterianos claves para la supervivencia de Xcc en forma epífita. La importancia de estos procesos para la sobrevivencia de Xcc los hace buenos blancos para el control de la dispersión de la enfermedad. Sin embargo, para lograr atacar estos procesos es necesario entender sus mecanismos e identificar formas de interferir con ellos.

Con ese objetivo, se observó el efecto de diferentes moléculas pequeñas capaces de interferir con la síntesis de la molécula señal de quorum sensing en Xcc, DSF, y en la formación de biofilm. Se observó que los donadores de óxido nítrico probados en este trabajo tienen efecto sobre la formación de biofilm de Xcc en superficie abiótica de placas de poliestireno. Posiblemente estos compuestos pueden interferir con las concentraciones del segundo mensajero GMP dicíclico a través de la regulación por proteínas con dominios PAS o HNOX y GGDEF o EAL. Sería interesante estudiar con mayor profundidad los mecanismos de inhibición y las proteínas involucradas.

El mayor efecto en la formación de biofilm se observó con el agregado de D-aminoácidos. El mecanismo responsable de esta inhibición se cree que es a través de modificaciones en la pared celular bacteriana y disparando la dispersión de las películas de biofilm. Si el efecto observado en Xcc en las placas de poliestireno se debe a efectos en la membrana o a una señalización más compleja del inicio de la dispersión o de ambos, deben ser estudiado con mayor profundidad. A su vez, en este estudio se vio diferentes grados de inhibición dependiendo del D-aminoácido, y estos efectos no necesariamente están ligados a la inhibición en el crecimiento.

La señalización por quorum sensing en Xcc es capaz de regular indirectamente la producción de enzimas extracelulares, la formación de biofilm y la motilidad. En este trabajo se determinó que el agregado del inhibidor de la síntesis de ácidos grasos triclosán puede revertir el fenotipo de la cepa salvaje al semejante a la cepa mutante en la formación de DSF. Más allá de las dificultades con la aplicación de triclosán en campo y su posible daño ambiental, sería interesante estudiar su efecto en el metabolismo de ácidos grasos de Xcc y los mecanismos responsables de su capacidad inhibitoria.

Finalmente, se determinó que la combinación D-arginina - sulfato de cobre sería la más prometedora para la aplicación en campo, no solo por el efecto en la inhibición de biofilm sino también por la ventaja de utilizar un D-aminoácido en lugar de un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos o un antibiótico en campo. Sin embargo,

el tratamiento debería ser ensayado nuevamente en planta antes de pensar en formulaciones aplicables en campo.

Referencias

- A.K. Das (2003). Citrus canker – A review. *J. Appl. Hort.* *5*, 52–60.
- An, S.-Q., Allan, J.H., McCarthy, Y., Febrer, M., Dow, J.M., and Ryan, R.P. (2014). The PAS domain-containing histidine kinase RpfS is a second sensor for the diffusible signal factor of *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.*
- Anfora, A.T., Halladin, D.K., Haugen, B.J., and Welch, R.A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 Is Adapted to Acetogenic Growth but Does Not Require Acetate during Murine Urinary Tract Infection. *Infect. Immun.* *76*, 5760–5767.
- Antoniani, D., Bocci, P., Maciag, A., Raffaelli, N., and Landini, P. (2010). Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *85*, 1095–1104.
- Arora, D.P., and Boon, E.M. (2012). Nitric oxide regulated two-component signaling in *Pseudoalteromonas atlantica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *421*, 521–526.
- Arruebarrena Di Palma, A., M. Pereyra, C., Moreno Ramirez, L., Xiqui Vázquez, M.L., Baca, B.E., Pereyra, M.A., Lamattina, L., and Creus, C.M. (2013). Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* *338*, 77–85.
- Attila, C., Ueda, A., and Wood, T.K. (2009). 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *82*, 525–533.
- Balcerzyk, A., Soszynski, M., and Bartosz, G. (2005). On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* *39*, 327–335.
- Barber, C.E., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wilson, T.J.G., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P., and Daniels, M.J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* *24*, 555–566.
- Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S.-H., Rice, S.A., Kjelleberg, S., and Webb, J.S. (2006). Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *188*, 7344–7353.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J.S., Hassett, D.J., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2009). Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. *J. Bacteriol.* *191*, 7333–7342.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. (2004). Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16630–16635.
- Brooun, A., Liu, S., and Lewis, K. (2000). A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 640–646.
- Buttke, T.M., and Ingram, L.O. (1978). Inhibition of unsaturated fatty acid synthesis in *Escherichia coli* by the antibiotic cerulenin. *Biochemistry (Mosc.)* *17*, 5282–5286.
- Campbell, J.W., and Cronan, J.E. (2001). BACTERIAL FATTY ACID BIOSYNTHESIS: Targets for Antibacterial Drug Discovery. *Annu. Rev. Microbiol.* *55*, 305–332.

- Caparrós, M., Torrecuadrada, J.L., and de Pedro, M.A. (1991). Effect of D-amino acids on *Escherichia coli* strains with impaired penicillin-binding proteins. *Res. Microbiol.* *142*, 345–350.
- Caparrós, M., Pisabarro, A.G., and Pedro, M.A. de (1992). Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *174*, 5549–5559.
- Carlson, H.K., Vance, R.E., and Marletta, M.A. (2010). H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilm formation in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*
- Casabuono, A., Petrocelli, S., Ottado, J., Orellano, E.G., and Couto, A.S. (2011). Structural Analysis and Involvement in Plant Innate Immunity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* *286*, 25628–25643.
- Cava, F., Lam, H., de Pedro, M.A., and Waldor, M.K. (2011). Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 817–831.
- Chang, Y.F., and Adams, E. (1974). D-lysine catabolic pathway in *Pseudomonas putida*: interrelations with L-lysine catabolism. *J. Bacteriol.* *117*, 753–764.
- Conrad, R.S., Massey, L.K., and Sokatch, J.R. (1974). D- and L-isoleucine metabolism and regulation of their pathways in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* *118*, 103–111.
- Crossman, L., and Dow, J.M. (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect.* *6*, 623–629.
- Cubero, J., and Graham, J.H. (2005). Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology* *95*, 1333–1340.
- Derbyshire, E.R., and Marletta, M.A. (2009). Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb. Exp. Pharmacol.* 17–31.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* *15*, 167–193.
- Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X., and Tang, J.-L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 10995–11000.
- Dow, J.M., Fouhy, Y., Lucey, J.F., and Ryan, R.P. (2006). The HD-GYP Domain, Cyclic Di-GMP Signaling, and Bacterial Virulence to Plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 1378–1384.
- Dunger, G., Relling, V.M., Tondo, M.L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E.G., and Ottado, J. (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.* *188*, 127–135.
- Gottwald, T.R., Hughes, G., Graham, J.H., Sun, X., and Riley, T. (2001). The Citrus Canker Epidemic in Florida: The Scientific Basis of Regulatory Eradication Policy for an Invasive Species. *Phytopathology* *91*, 30–34.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H., and Schubert, T.S. (2002). Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. *Plant Health Prog.*
- Guo, Y., Zhang, Y., Li, J.-L., and Wang, N. (2012). Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing Plays a Central Role in Coordinating Gene Expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *25*, 165–179.
- Hammes, W.P. (1978). The LD-Carboxypeptidase Activity in *Gaffkya homari*. *Eur. J. Biochem.* *91*, 501–507.

- He, Y.-W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y.-J.A., Wen, C.-M., Wang, L.-H., Liu, Z.-D., Zhang, H.-B., Dong, Y.-H., Dow, J.M., et al. (2006a). Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell–cell communication-dependent genes and functions. *Mol. Microbiol.* *59*, 610–622.
- He, Y.-W., Wang, C., Zhou, L., Song, H., Dow, J.M., and Zhang, L.-H. (2006b). Dual Signaling Functions of the Hybrid Sensor Kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* Involve Either Phosphorelay or Receiver Domain-Protein Interaction. *J. Biol. Chem.* *281*, 33414–33421.
- Hetrick, E.M., Shin, J.H., Paul, H.S., and Schoenfisch, M.H. (2009). Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials* *30*, 2782–2789.
- Hochbaum, A.I., Kolodkin-Gal, I., Foulston, L., Kolter, R., Aizenberg, J., and Losick, R. (2011). Inhibitory Effects of d-Amino Acids on *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* *193*, 5616–5622.
- Hoffman, L.R., D’Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., and Miller, S.I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* *436*, 1171–1175.
- Jw, C., Gg, G., and Kj, C. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.* *238*, 86–95.
- Kim, P.M., Duan, X., Huang, A.S., Liu, C.Y., Ming, G., Song, H., and Snyder, S.H. (2010). Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 3175–3179.
- Kleckner, N., and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* *241*, 835–837.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., and Losick, R. (2010). D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science* *328*, 627–629.
- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J.G., and Nijland, R. (2010). Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *86*, 813–823.
- Lee, J., Page, R., García-Contreras, R., Palermino, J.-M., Zhang, X.-S., Doshi, O., Wood, T.K., and Peti, W. (2007). Structure and function of the *Escherichia coli* protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance. *J. Mol. Biol.* *373*, 11–26.
- Levy, C.W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, P.J., Stuitje, A.R., Slabas, A.R., Rice, D.W., and Rafferty, J.B. (1999). Molecular basis of triclosan activity. *Nature* *398*, 383–384.
- Li, J., and Wang, N. (2011a). The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Mol. Plant Pathol.* *12*, 381–396.
- Li, J., and Wang, N. (2011b). Genome-Wide Mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Reveals Novel Genetic Determinants and Regulation Mechanisms of Biofilm Formation. *PLoS ONE* *6*, e21804.
- Li, J., and Wang, N. (2011c). Genome-Wide Mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Reveals Novel Genetic Determinants and Regulation Mechanisms of Biofilm Formation. *PLoS ONE* *6*, e21804.
- Li, J., and Wang, N. (2013). Foliar Application of Biofilm Formation–Inhibiting Compounds Enhances Control of Citrus Canker Caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Phytopathology* *104*, 134–142.
- Li, H., Zhang, X., Bi, L., He, J., and Jiang, T. (2011). Determination of the Crystal Structure and Active Residues of FabV, the Enoyl-ACP Reductase from *Xanthomonas oryzae*. *PLoS ONE* *6*, e26743.

- Liu, N., Xu, Y., Hossain, S., Huang, N., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Boon, E.M. (2012). Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 2087–2099.
- McMurry, L.M., Oethinger, M., and Levy, S.B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* *394*, 531–532.
- Moreira, L.M., Almeida, N.F., Potnis, N., Digiampietri, L.A., Adi, S.S., Bortolossi, J.C., Silva, A.C. da, Silva, A.M. da, Moraes, F.E. de, Oliveira, J.C. de, et al. (2010). Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* *11*, 238.
- Oppenheimer-Shaanan, Y., Steinberg, N., and Kolodkin-Gal, I. (2013). Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. *Trends Microbiol.* *21*, 594–601.
- Plate, L., and Marletta, M.A. (2012). Nitric Oxide Modulates Bacterial Biofilm Formation through a Multicomponent Cyclic-di-GMP Signaling Network. *Mol. Cell* *46*, 449–460.
- Privett, B.J., Nutz, S.T., and Schoenfisch, M.H. (2010). Efficacy of surface-generated nitric oxide against *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Biofouling* *26*, 973–983.
- Privett, B.J., Broadnax, A.D., Bauman, S.J., Riccio, D.A., and Schoenfisch, M.H. (2012). Examination of bacterial resistance to exogenous nitric oxide. *Nitric Oxide* *26*, 169–173.
- Pruvost, O., Boher, B., Brocherieux, C., Nicole, M., and Chiroleu, F. (2002). Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Leaf Lesions Under Tropical Environmental Conditions and Simulated Splash Dispersal of Inoculum. *Phytopathology* *92*, 336–346.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* *288*, 481–487.
- Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P.S., Qüesta, J., Dow, J.M., Castagnaro, A.P., Vojnov, A.A., et al. (2007a). Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *20*, 1222–1230.
- Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P.S., Qüesta, J., Dow, J.M., Castagnaro, A.P., Vojnov, A.A., et al. (2007b). Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *20*, 1222–1230.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.-W., Zhang, L.-H., Heeb, S., Cámara, M., Williams, P., et al. (2006). Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 6712–6717.
- Ryan, R.P., Vorhölter, F.-J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.-A., Bogdanove, A.J., and Dow, J.M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 344–355.
- Schouties, C.L., Civerolo, E.L., Miller, J.W., Stall, R.E., Krass, C.J., Poe, S.R., and DuCharme, E.P. (1987). Citrus canker in Florida. *Plant Dis.* *71*, 388–395.
- Da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Sluys, M.A.V., Almeida, N.F., Alves, L.M.C., et al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* *417*, 459–463.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 187–209.

- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., Chikindas, M.L., and Yaron, S. (2007). Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* *267*, 200–206.
- Ueda, A., Attila, C., Whiteley, M., and Wood, T.K. (2009). Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist. *Microb. Biotechnol.* *2*, 62–74.
- Vedantam, G., and Nichols, B.P. (1998). Characterization of a mutationally altered dihydropteroate synthase contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* *N 4*, 91–97.
- Wengelnik, K., and Bonas, U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* *178*, 3462–3469.
- Wolosker, H. (2007). NMDA Receptor Regulation by D-serine: New Findings and Perspectives. *Mol. Neurobiol.* *36*, 152–164.
- Wolosker, H., Panizzutti, R., and Miranda, J.D. (2002). Neurobiology through the looking-glass: d-serine as a new glial-derived transmitter. *Neurochem. Int.* *41*, 327–332.
- Yarullina, D.R., Vakatova, L.V., Krivoruchko, A.V., Rubtsova, E.V., and Ilinskaya, O.N. (2013). Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on biofilm formation by *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology* *82*, 423–427.
- Zhang, X., Francis, M.I., Dawson, W.O., Graham, J.H., Orbović, V., Triplett, E.W., and Mou, Z. (2010). Over-expression of the *Arabidopsis* NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur. J. Plant Pathol.* *128*, 91–100.
- Zumft, W.G. (1993). The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbiol.* *160*, 253–264.

Apéndice I

Lista de abreviaturas

3-quetoacil ACP sintasa del inglés, 3 – keto-acyl – ACP- synthase

5 – FU fluoruracilo

ACP reductasa del inglés, acyl carrier protein

ADN ácido desoxirribonucleico

ci-di-GMP GMP dicíclico

D-Arg D-arginina

D-Glu D-glutamina

D-Glu Ac D- ácido glutámico

D-Lys D-lisina

D-Thr D-treonina

D-Val D-valina

DGC diguanilato ciclasas

DSF del inglés, Diffusible Signal Factor

Enoil – ACP reductasa del inglés, enoyl ACP reductase

GFP del inglés, green fluorescent protein

MIC mínima concentración inhibitoria

NA del inglés, nutrient agar

NB del inglés, nutrient broth

NO óxido nítrico

ppm partes por millón

THF tetrahidrofolatos

Xcc *Xanthomonas citri* subesp. *citri*

Apéndice II

Medios de cultivo

NA : Peptona A 6,0 g; Extracto de carne 1,0 g; Agar 15 g; Extracto de levadura 2,0 g; NaCl 5,0 g, agua, csp 1000 ml.

NB : Peptona A 6,0 g; Extracto de carne 1,0 g; NaCl 5,0 g, agua csp 1000 ml.

XVM2 (Wengelnik and Bonas, 1996) : NaCl 1,16 g; $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 1,32 g; MgSO_4 0,6 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,147 g, KH_2PO_4 160 μL (solución 1M); K_2HPO_4 320 μL (solución 1M), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 μL (solución 250 mM), agua csp 1000 ml ajustar el pH a 6.7