

MARIA EMILENE MARTINO CAMPOS

**OBTENÇÃO DE MUTANTES DE BACTÉRIAS
PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE LEITE
DEFICIENTES NA PRODUÇÃO DE MOLÉCULA SINAL
DE *QUORUM SENSING***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

MARIA EMILENE MARTINO CAMPOS

**OBTENÇÃO DE MUTANTES DE BACTÉRIAS
PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE LEITE
DEFICIENTES NA PRODUÇÃO DE MOLÉCULA SINAL
DE *QUORUM SENSING***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 30 de Julho de 2008.

Prof^ª. Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Co-orientador)

Prof^ª. Elza Fernandes Araújo
(Co-orientador)

Prof^ª Mirim Terezinha dos Santos

Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Aos amigos da Microbiologia - UFV
MAIS UMA VEZ, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em cada instante de minha vida, iluminando meus passos, me permitindo trilhar com sucesso.

Aos meus pais por me concederem a vida, pela educação, formação e retribuírem meu imenso amor.

Aos meus irmãos, Emilio e Maria Emilia, grandes entusiastas de minha vitória, aos quais tenho amor incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela excelente estrutura e por oportunizar a realização desta pesquisa.

À FAPEMIG pelo suporte financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela compreensão, inteligência, exemplo de profissional e ser humano.

Às minhas co-orientadoras Andréa de Oliveira Barros Ribon e Elza Fernandes Araújo, pelas sugestões, disponibilidade e paciência.

Aos funcionários e amigos dos laboratórios pela amizade, apoio e por tornarem mais agradáveis e alegres o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma forma tenham colaborado e àqueles que torcem e se alegram com minhas conquistas.

A vocês minha imensa gratidão e carinho.

BIOGRAFIA

MARIA EMILENE MARTINO CAMPOS, filha de Emilio José Campos Toledo e Maria José Martino de Campos, nasceu em Viçosa - MG, em 07 de março de 1983.

Em maio de 2006 graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

No mesmo mês, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos, defendendo dissertação em 30 de julho de 2008 e para dar continuidade a este trabalho, iniciou, no mês seguinte, o doutorado neste mesmo programa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O mecanismo de <i>quorum sensing</i> em bactérias Gram-negativas.....	3
2.2. Regulação do mecanismo <i>quorum sensing</i>	6
2.2.1. Compostos inibidores da biossíntese da molécula sinal	7
2.2.2. Inativação química	7
2.2.3. Antagonistas de <i>quorum sensing</i>	8
2.2.4. Degradação da molécula sinal por lactonases e acilases.....	10
2.2.5. Uso de mutantes para elucidar o mecanismo de <i>quorum sensing</i>	12
2.3. Importância do conhecimento do mecanismo de <i>quorum sensing</i> para a microbiologia de alimentos	13

3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo	15
3.2. Caracterização fisiológica das bactérias	17
3.3. Obtenção de células eletrocompetentes de <i>H. alvei</i> e <i>E. cloacae</i>	18
3.4. Construção de vetores	19
3.4.1. Clonagem e expressão do gene que codifica gentamicina-3- acetiltransferase	19
3.4.2. Inativação do gene <i>hall68</i> pela integração do gene que confere resistência a gentamicina	20
3.5. Clivagem do vetor suicida pGP704	23
3.6. Obtenção de mutantes Hal ^r	23
3.7. Confirmação da mutação no gene <i>hall</i>	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Caracterização das estirpes de <i>H. alvei</i> e <i>E. cloacae</i>	24
4.2. Construção de vetores	25
4.2.1. Clonagem e expressão do gene que codifica a gentamicina-3- acetiltransferase	25
4.2.2. Inativação de <i>hall</i> com o gene que confere resistência à gentamicina	27
4.3. Obtenção de mutantes Hal ^r	32
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE ABREVIações

- ACP – Proteína carreadora do grupo acil
- AHL – Homoserina lactona acilada
- AI – Autoindutor
- DKP – Dicetopiperazina
- EMB – Eosina azul de metileno
- HHL – N-hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL)
- IMViC – Testes bioquímicos de Indol, Vermelho de metila, Voges-Proskauer e Citrato.
- LB – Lúria Bertani
- OHHL – N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL)
- ORF – Sequência aberta de leitura
- 3-oxo-C12-HSL – 3-oxo-dodecanoil-DL-homoserina lactona
- MIC – Concentração mínima inibitória
- PAIs – Peptídeos autoindutores
- pb – Pares de base
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PQS – 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona
- QS – *Quorum sensing*
- SAM – S-adenosil metionina
- SIM – Sulfureto indol motilidade
- UFC – Unidades formadoras de colônia

RESUMO

CAMPOS, Maria Emilene Martino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. Obtenção de mutantes de bactérias psicrotróficas isoladas de leite deficientes na produção de molécula sinal de *Quorum sensing*. Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon e Elza Fernandes Araújo.

Quando em alta densidade populacional, muitas bactérias são capazes de coordenar a expressão de genes via produção e recepção de sinais químicos, por meio de mecanismo denominado *quorum sensing*. O objetivo deste trabalho foi obter mutantes *hall*⁻ das estirpes psicrotróficas isoladas do leite cru refrigerado, 068 e 071 de *Hafnia alvei* e 067 de *Enterobacter cloacae*. O gene *hall* codifica a sintase responsável pela produção de acil homoserina lactonas (AHLs) que são as moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em *H. alvei* e *E. cloacae*. Para obtenção dos mutantes, foi utilizado o vetor suicida pGP704, onde foi clonado o gene *hall*. Em seguida este gene foi interrompido com o gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase, que confere resistência ao antibiótico gentamicina e o plasmídeo foi denominado pGP704*hall*068::Gm. A transformação das estirpes psicrotróficas com esse vetor resultou em transformantes resistentes a 25 µg mL⁻¹ de gentamicina, mas que ainda produziam AHL, constatada por meio da indução da estirpe monitora de AHL, *Chromobacterium violaceum* CV 026. A inativação da expressão do gene *hall* no DNA cromossômico foi obtida após nova transformação desses

transformantes com o vetor pUT::Tn5, pertencente ao mesmo grupo de compatibilidade de pGP704. O uso deste sistema de incompatibilidade propiciou a seleção de estirpes onde ocorreu a recombinação homóloga entre o gene *hall* interrompido pelo gene que confere resistência a gentamicina com o gene *hall* presente no DNA cromossômico. A confirmação da recombinação do gene *hall* inativado e clonado no plasmídeo com o gene *hall* cromossômico, foi feita selecionando-se os transformantes em ágar Luria Bertani contendo 50 µg mL⁻¹ de canamicina e gentamicina. Por ensaio de indução de *C. violaceum* CV026, foi confirmado que os transformantes resistentes a canamicina e gentamicina não induziram a produção do pigmento violaceína pela estirpe monitora. A inativação do gene *hall* no cromossoma torna essas estirpes ferramentas importantes para elucidação da regulação da expressão de genes pelo mecanismo de *quorum sensing*.

ABSTRACT

CAMPOS, Maria Emilene Martino, M.Sc., Federal University of Viçosa, July 2008.
Production of psychotrophic bacteria mutants isolated from milk lacking the signal molecule de *quorum sensing*. Advisor: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisors: Andréa de Oliveira Barros Ribon and Elza Fernandes Araújo.

When population density is high, several bacteria are able to coordinate gene expression by production and reception of chemical signals by means of a mechanism called *quorum sensing*. The scope of this work was to produce *Hall* mutants from psychotrophic bacterias found in fresh cooled milk, 068 and 071 of *Hafnia alvei* and 067 of *Enterobacter cloacae*. The *hall* gene encodes the synthase responsible for the production of acyl-homoserine lactones (AHLs) which are the signaling molecules of *quorum sensing* for *H. alvei* and *E. cloacae*. In order to produce the mutants, it was used the suicide vector pGP704, where the *hall* gene was cloned. After that, this gene was interrupted with a gene that encodes the protein gentamicin 3-acetyltransferase, responsible for giving resistance to the gentamicin antibiotic. This vector was called pGP704*hall*068::Gm. The transformation of psychotrophic strain with such vector resulted in transformants cells resistant to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of gentamicin, but they would still produce AHL. AHL production was confirmed by the induction of the monitored strain of AHL, *Chromobacterium violaceum* CV 026. Expression inactivation of the *hall* gene in the chromosomic DNA was achieved after new transformation of former transformants with the pUT::Tn5 vector, which belong to the same compatible group of pGP704. The use of this system of incompatibility provided the selection of strain that showed

homologous recombination between the *hall* gene interrupted by the gene that affords resistance to gentamicin and the *hall* gene of the present chromosomal DNA. Recombination assurance of the *hall* gene inactivated and cloned in the plasmidium with the *hall* chromosomal gene was done by selecting the transformants in Luria-Bertani agar containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of kanamycin and gentamicin. By means of an induction trial of *C. violaceum* CV026, it was confirmed that the transformants resistant to kanamycin and gentamicin did not induced the production of the violacein pigment by the strain being monitored. Inactivation of the *hall* gene in the chromosome makes these strains important tools for elucidating gene expression regulation by the *quorum sensing* mechanism.

1. INTRODUÇÃO

Muitas bactérias são capazes de regular a expressão de características fenotípicas em função da alta densidade populacional por meio do mecanismo denominado *quorum sensing*. As moléculas sinalizadoras deste mecanismo de comunicação são utilizadas como sensores da população para coordenar a regulação da expressão gênica.

Em muitas das bactérias Gram-negativas estudadas, o *quorum sensing* é mediado por pequenas moléculas sinalizadoras N-aciladas, derivadas de L-homoserina lactona (AHL), que podem diferir no comprimento da cadeia e substituições no sítio acil. A síntese dessas moléculas é mediada por proteínas que constituem uma família evolutivamente conservada de homólogos conhecidas como sintases de autoindutores LuxI. Um exemplo de proteína com mesma função de LuxI é a sintase Hall, responsável pela produção de AHL em *Hafnia alvei*. Essa sintase é codificada pelo gene *hall* que apresenta alta identidade de sequência de nucleotídeos com o gene que codifica a sintase envolvida na síntese das moléculas sinalizadora de *quorum sensing* em *Enterobacter cloacae*.

Quando é atingida uma concentração limiar de AHL no meio, ocorre a alteração da expressão gênica da população bacteriana, o que regula vários processos fisiológicos, incluindo virulência, metabolismo secundário, formação de biofilme, produção de exoenzimas, estruturas de associação com organismos superiores e bioluminescência.

O conhecimento do mecanismo de *quorum sensing* permitirá o desenvolvimento de sistemas que permitam manipular o processo de sinalização célula-célula a fim de inibir o crescimento ou a expressão de genes em diferentes ambientes, incluindo nos alimentos.

O sistema *quorum sensing* pode ser elucidado adotando-se estratégias experimentais que envolvam a inibição da comunicação entre células. Esta inibição, em bactérias Gram-negativas pode ser alcançada com o uso de compostos inibidores da biossíntese de AHLs, pelo uso de antagonistas de *quorum sensing*, pela degradação da molécula sinal por lactonases e acilases de origem microbiana ou pela obtenção de mutantes deficientes em comunicação célula-célula.

Uma das maneiras mais diretas de descobrir qual é a função de um gene é observar o fenótipo do organismo quando o gene é mutado. Como as mutações podem interromper os processos celulares, os mutantes, frequentemente, têm a chave para o entendimento da função do gene, o que permite o avanço da genômica funcional.

Considerando a importância de se conhecer os mecanismos regulatórios das atividades bacterianas que resultam fenótipos associados com a deterioração de alimentos, este trabalho teve como objetivo geral obter mutantes para o gene *hall*, responsável pela síntese de AHLs em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru. E como objetivos específicos, visou a obtenção de células eletrocompetentes de bactérias psicrotróficas isoladas do leite e a inativação da transcrição de *hall* pelo sistema de incompatibilidade de plasmídeos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O mecanismo de *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas

Atualmente, sabe-se que existem diversas interações e sistemas de comunicação entre as células bacterianas que produzem um repertório extensivo de metabólitos secundários e respondem a várias substâncias químicas presentes no ambiente. Grupos particulares de metabólitos secundários têm sido caracterizados quanto à sua função na regulação da expressão de genes de um modo dependente de densidade populacional por um mecanismo denominado *quorum sensing* (QS) (FUQUA e PARSEK, 2001; KELLER e SURETTE, 2006).

O sistema de comunicação dependente da densidade populacional entre células bacterianas foi primeiramente descrito em *Vibrio fischeri*, uma espécie simbiótica que provê com luz seu hospedeiro eucariótico, a lula *Euprymna scolopes*. A emissão de luz depende da transcrição do regulon luciferase, que ocorre quando a densidade populacional é alta o suficiente para produzir o acúmulo limiar de autoindutor secretado, uma acil homoserina lactona (AHL) específica (FUQUA *et al.*, 1994). A biossíntese de AHL em *V. fischeri* é codificada pelo gene *luxI*. Sob certa concentração, o autoindutor se liga na proteína LuxR, resultando em um complexo que ativa a transcrição de genes alvos pela ligação ao promotor luciferase, em um sítio específico de 20 pb denominado box *lux* (Figura 1). Sistemas de QS compostos de homólogos a LuxI/LuxR e AHL como autoindutores têm sido observados em

muitas bactérias Gram-negativas e envolvidas na regulação de vários processos fisiológicos. Esse sincronismo individual com atividade em grupo resulta em diversos benefícios, incluindo a produção de antibióticos, formação de biofilme, bioluminescência em espécies de *Vibrio*, diferenciação celular, competência para captação de DNA, crescimento, produção de pigmento, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, esporulação, motilidade, produção de toxina e expressão de genes de virulência (MCDOUGALD *et al.*, 2007; NASSER e REVERCHON, 2007). Além desses, o sistema *QS* também facilita o acesso a nutrientes complexos ou a nichos no ambiente, propicia defesa coletiva contra outros microrganismos competidores ou contra mecanismos de defesa do hospedeiro eucarioto e otimiza a sobrevivência da população por meio da diferenciação em formas morfológicas melhor adaptadas para sobreviver em condições ambientais adversas (SWIFT *et al.*, 2001).

Em bactérias patogênicas, a produção de fatores de virulência é induzida somente quando a população bacteriana for suficientemente elevada para sobreviver a resposta imune do hospedeiro (SMITH *et al.*, 2004; BOTTOMLEY *et al.*, 2007).

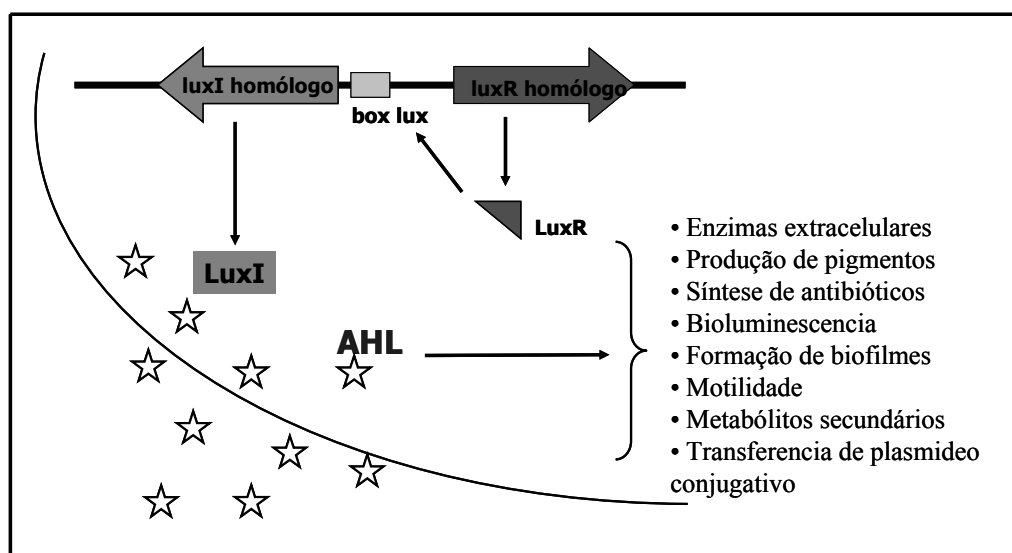


Figura 1 – Modelo proposto para o mecanismo de *QS* em bactérias Gram-negativas. As AHLs (estrelas) são sintetizadas por proteínas tipo LuxI e são detectadas por proteínas tipo LuxR. As AHLs difundem-se livremente pela célula e concentram-se no ambiente em proporção ao aumento da população. As proteínas LuxR, quando ligadas ao autoindutor, ligam-se ao *box lux* específico e ativam a transcrição de genes alvo responsáveis pela expressão de diversos fenótipos.

As moléculas sinalizadoras de *QS* podem ser divididas em quatro categorias: (1) derivados de ácidos graxos, conhecidos como autoindutores-1 (AI-1), geralmente N-acil homoserinas lactonas (AHLs), usados por bactérias Gram-negativas para a comunicação intraespécie (MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al.*, 2001); (2) furanosil borato diéster, autoindutor-2 (AI-2), produzido por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e utilizado para comunicação intra e interespécie (SHAUDER e BASSLER, 2001; CHEN *et al.*, 2002); (3) autoindutor-3 (AI-3), de estrutura desconhecida (SPERANDIO *et al.*, 2003); (4) aminoácidos e peptídeos pequenos utilizados por bactérias Gram-positivas (MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al.*, 2001). Além desses, dipeptídeos cíclicos, como dicetopiperazinas (DKPs) (HOLDEM *et al.*, 1999; DEGRASSI *et al.*, 2002) e 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), podem estar envolvidos na sinalização célula-célula (PESCI *et al.*, 1999).

Em pelo menos 30 espécies de bactérias Gram-negativas, o *QS* é mediado por moléculas sinalizadoras N-aciladas derivadas de AHL, que podem diferir no comprimento, variando de quatro a 16 carbonos e no grau de substituição e saturação na posição C3, a qual não é modificada ou carrega um grupamento oxo ou uma hidroxila (CHRISTENSEN *et al.*, 2003; PILLAI e JSEUDHASAN, 2006). Cadeias curtas de AHL se difundem livremente pela membrana, enquanto que cadeias longas requerem uma bomba de efluxo (PILLAI e JSEUDHASAN, 2006). As diferenças na estrutura da molécula AHL (Figura 2) garantem grau de especificidade do reconhecimento pelo regulador cognato. Essa especificidade de interação é essencial para que a bactéria diferencie sua própria AHL das produzidas por outras espécies (PILLAI e JSEUDHASAN, 2006).

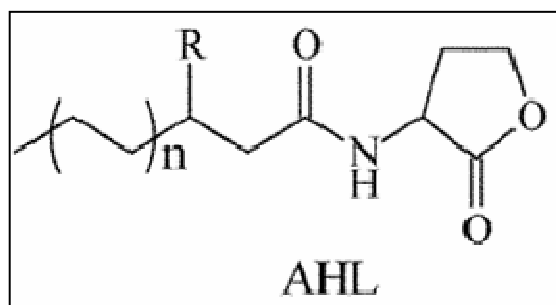


Figura 2 – N- acil homoserina lactona, molécula sinalizadora de *QS* em bactérias Gram-negativas. Fonte: Defoirdt *et al.*, 2004.

Três diferentes famílias de sintase de AHL têm sido relatadas: LuxI, AinS e HdtS. As proteínas homólogas a LuxI são as principais classes de enzimas responsáveis pela síntese de AHL e estão presentes em mais de 50 espécies, incluindo α -, β - e γ - proteobactéria. Essas enzimas utilizam S-adenosil-metionina (SAM) para sintetizar o anel homoserina lactona, enquanto a cadeia acila é proveniente do metabolismo de lipídeos e carregada por diferentes proteínas acil-carreadoras (ACP). A reação é iniciada pela ligação de SAM a sintase seguida pela ACP-acilada, com formação da ligação amida e o holo-ACP é liberado previamente a lactonização e liberação da molécula sinal AHL (NASSER e REVERCHON, 2007).

A organização genética da família LuxI é tão diversa quanto suas funções e várias espécies bacterianas contêm proteínas com mesma função de LuxI e, ou LuxR para a produção ou detecção de sinais distintos e variados. Genes homólogos de *luxI* são identificados em cromossomos bacterianos e em elementos extracromossomais. Como exemplos, citam o gene *swrA*, homólogo de *luxI*, de *Serratia liquefaciens* MG1 que regula a motilidade por espalhamento (LINDUM *et al.*, 1998); o gene *ahyI* de *Aeromonas hydrophila* (SWIFT *et al.*, 1999) e o gene *hall* em *H. alvei* que regulam a expressão de exoproteases (BRUHN *et al.*, 2004; MARTINS, 2007).

O gene *hall*, que codifica a sintase de AHLs em estirpes de *H. alvei*, foi clonado e expresso em *E. coli* XL1-Blue, e apresentou 660 bp e codifica uma proteína com 216 aminoácidos responsável pela produção de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL) e N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL) (MARTINS, 2007). Um gene homólogo foi clonado e sequenciado em *Enterobacter* sp. isolado de leite cru refrigerado, apresentou identidade de até 99% com o gene *hall* de *H. alvei* (MARTINS, 2007).

2.2. Regulação do mecanismo QS

Existe grande interesse na elucidação do mecanismo de QS para desenvolver sistemas que permitam manipular o processo de sinalização célula-célula a fim de inibir o crescimento ou mecanismos de virulência em diferentes ambientes, incluindo nos alimentos (SMITH *et al.*, 2004).

Estratégias experimentais que envolvam a inibição da comunicação entre células são usualmente adotadas no estudo do mecanismo de QS. Esta inibição pode

ser alcançada por meio do uso de compostos que inibam a biossíntese ou inativem quimicamente a molécula sinal, pelo uso de antagonistas de *QS*, pela degradação da molécula sinal por lactonases e acilases de origem microbiana ou por obtenção de mutantes deficientes em comunicação célula-célula.

2.2.1. Compostos inibidores da biossíntese da molécula sinal

A biossíntese de AHL é dada por uma sequência de reações, envolvendo a SAM, doadora do grupo amino para formação do anel homoserina lactona e uma proteína carreadora do grupo acila (ACP), precursor da cadeia acil da molécula AHL. Vários análogos de SAM como S-adenosilhomocisteína, S-adenosilcisteína e sinefungina são utilizados como potentes inibidores da síntese de AHL catalisada pela proteína RhlI de *Pseudomonas aeruginosa* (HENTZER e GIVSKOV, 2003).

2.2.2. Inativação química

A alteração do pH também pode ser usada como uma estratégia para inibir o mecanismo de *QS*, pois o aumento do pH resulta na hidrólise alcalina da molécula sinal (HENTZER e GIVSKOV, 2003).

Summmerfelt (2003) propôs uma estratégia para inativação da molécula sinal de patógenos e sugeriu o uso de antimicrobianos halogenados juntamente com variação no pH (Figura 3). Nesse processo, a destabilização da estrutura de AHL e inibição do mecanismo de *QS* ocorreu após o tratamento com os ácidos hipocloroso e hipobromoso em pH 6,0, que promoveram a halogenação da molécula de AHL, com subsequente hidrólise da cadeia acila em pH 3,0 e, finalmente, a hidrólise alcalina do anel lactona quando o pH foi modificado para 8,0.

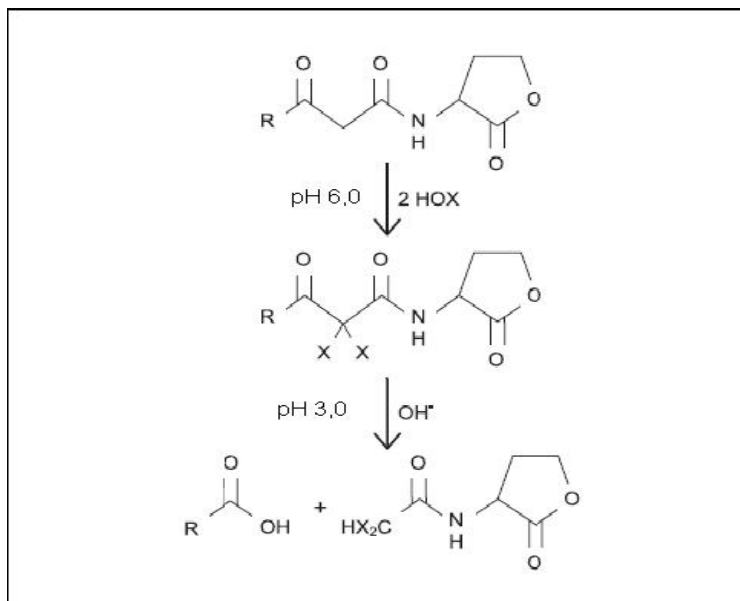


Figura 2 – Proposta de inativação química de AHL pelas reações entre 3-oxo AHL e antimicrobianos halogenados (HOX; ácido hipobromoso e hipocloroso) sob variação do pH. Fonte: Summmerfelt (2003).

2.2.3. Antagonistas de QS

Desde a descoberta das AHLs, estudos foram realizados no intuito de relacionar a estrutura da molécula com a sua atividade, tendo como foco inicial a cadeia acilada (EBEHARD *et al.*, 1986; PASSADOR *et al.*, 1996; SCHAEFER *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 1998). Demonstrou-se que o comprimento da cadeia acilada pode ser alterado com efeito mínimo na atividade mas, no entanto, mudanças significativas no comprimento da cadeia ou no ligante da terceira posição eliminaram a atividade da molécula. Outros estudos verificaram que é necessário que a cadeia acila seja linear.

O estudo realizado por Reverchon *et al.* (2002) envolveu a síntese de 22 moléculas de AHLs contendo várias substituições na quarta posição da cadeia acilada de N-(3-oxo-hexanoil)-L- homoserina lactona. Esses análogos foram então avaliados quanto à ativação ou inibição da bioluminescência em *Vibrio fischeri*. A análise revelou diferenças entre os análogos substituídos por alquil ou aril, sendo que a maioria dos análogos substituídos por alquil manteve alguma potência como

agonistas, enquanto a maioria dos análogos substituídos por aril foi convertida em antagonistas. Os autores afirmaram que interações inibitórias específicas ocorrem entre o grupo aril substituído e alguns resíduos de AHL na região de ligação da proteína LuxR que não ocorrem quando o substituinte é um grupo alquil.

Alguns compostos naturalmente presentes em plantas como o eugenol e outros óleos essenciais e compostos polifenólicos também apresentaram efeito inibidor na expressão de genes controlados por *QS* (MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

Compostos sintéticos também podem ter ação sobre o *QS*. Segundo Riedel *et al.* (2006), antagonistas de AHLs sintetizados a partir da solução de 3-(tert-butil)-1-metilprazol-5-carbonil clorido, diminuíram a atividade proteolítica de *Burkholderia cenocepacia*, por meio da inibição do sistema de *QS*.

As furanonas halogenadas, produzidas pela alga vermelha *Delisea pulchra* também são capazes de interferir na sinalização bacteriana mediada por AHLs por prevenir a ligação da molécula sinalizadora ao sítio receptor (PILLAI e JESUDHASAN, 2006) (Figura 4). Viana (2006) comprovou que 1 mol L⁻¹ de 2(5H)-furanona não afetou o crescimento de *H. alvei*, porém reduziu o número de células aderidas em cupons de aço inoxidável, o que pode indicar que a inibição da formação de biofilme esteja relacionada com interferência no sistema de *QS*.

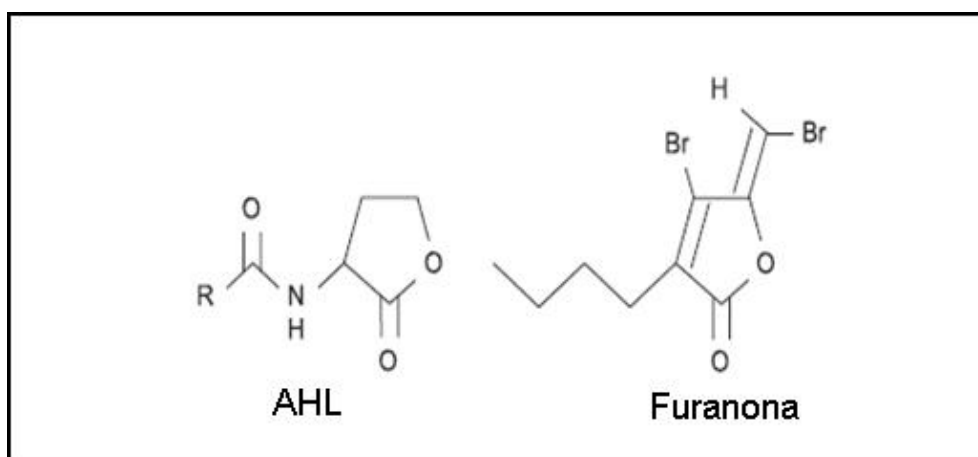


Figura 3 – Similaridade estrutural entre AHL e a furanona halogenada produzidas pela alga vermelha *Delisea pulchra*. Fonte: Pillai *et al.* (2006).

2.2.4. Degradação da molécula sinal por lactonases e acilases

Duas classes de enzimas que degradam AHLs foram descritas: (1) lactonases de AHL (*aiiA* e homólogos *attM*), que hidrolisam o anel lactona, e (2) as acilases de AHL, que hidrolisam a ponte amida entre a cadeia de ácido graxo e a molécula de homoserina lactona (DONG *et al.*, 2000; LEADBETTER e GREENBERG, 2000; DONG *et al.* 2002; LIN *et al.*, 2003) (Figura 5). Pesquisas em bancos de dados de homólogos das lactonases e acilases mostram sua existência em um grande número de espécies, o que indica que a atividade dessas enzimas é disseminada na natureza (ROCHE *et al.*, 2004).

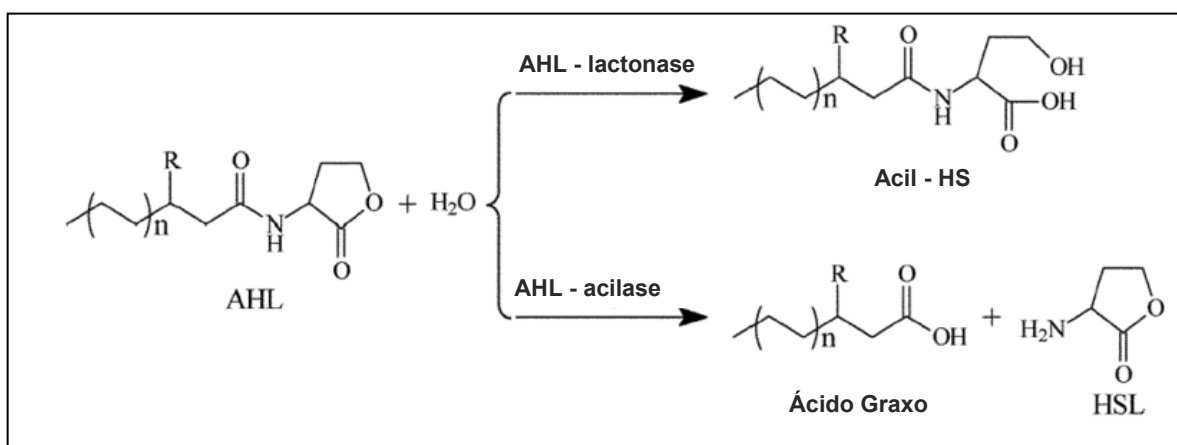


Figura 4 – Mecanismo de ação das lactonases e acilases na molécula de AHL. Fonte: Defoirdt *et al.* (2004).

DONG *et al.* (2000) isolaram uma espécie de *Bacillus* capaz de inativar AHLs e clonaram o gene que codifica a lactonase que atua na hidrólise do anel lactona. Posteriormente, DONG *et al.* (2001) verificaram que plantas transgênicas que apresentavam atividade de lactonase foram mais resistentes à *Erwinia carotovora*, um patógeno de plantas que requer AHL para a expressão de genes necessários para a patogenicidade.

O gene *aiiA*, que codifica a lactonase de *Bacillus*, foi clonado e expresso em *Agrobacterium tumefaciens* (ZHANG *et al.*, 2002), *Bacillus thuringiensis* (DONG *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002), *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* (DONG *et al.*, 2002).

A expressão do gene *aiiA* de *Bacillus anthracis* em *Burkholderia thailandensis* impediu o acúmulo N-decanoil homoserina lactona e de N-octanoil homoserina lactona e reduziu as concentrações de N-hexanoil homoserina lactona, o que resultou em alteração da motilidade por espalhamento e contração, causou um aumento significativo no tempo de geração e afetou o metabolismo de carbono (ULRICH, 2004). Esse mesmo autor verificou que a expressão heteróloga de pME6863, contendo gene *aiiA* de *B. cereus*, resultou no aumento da motilidade por espalhamento, mostrando que pode existir regulação negativa pelo sistema de *QS*.

Martins (2007) obteve um transconjugante de *Enterobacter* sp. 067 com pBHR-*aiiA* com sistema de *QS* comprometido e incapaz de acumular AHL em sobrenadante do caldo Luria Bertani (LB). Entretanto, não foi possível expressar a enzima lactonase de pBHR-*aiiA* nas estirpes de *H. alvei* 068 e 071 transconjugantes, o que impossibilitou a avaliação dos fenótipos regulados por *QS* nessas bactérias (MARTINS, 2007). O transconjugante *Enterobacter* sp. 067 mostrou ser mais proteolítico do que a estirpe selvagem, indicando que o mecanismo de *QS* regula negativamente a atividade proteolítica nessa bactéria. Usando o mesmo transconjugante, identificado com *E. cloacae* 067, Ponce (2007) verificou a redução da capacidade de adesão em superfícies de aço inoxidável e poliestireno, além da capacidade de liquefazer gelatina e de coagular o leite em menor espaço de tempo do que a estirpe selvagem. No sobrenadante livre de células dessa mesma estirpe transconjugante foi constatado menor número de bandas de proteínas extracelulares do que as produzidas pela *E. cloacae* 067 selvagem, sugerindo que o sistema *QS* pode estar envolvido na regulação de outras proteínas extracelulares, além de proteases.

Outro exemplo de mecanismo de interferência com o *QS* por meio da degradação ou inativação da molécula-sinal foi apresentado por Leadbetter e Greenberg (2000), que isolaram *Variovorax paradoxus* do solo, capazes de sintetizar enzimas acilases que degradam AHLs e liberam homoserina lactona e ácido graxo, usado então como única fonte de carbono e energia.

2.2.5. Uso de mutantes para elucidar o mecanismo *QS*

As estratégias citadas anteriormente são válidas para a caracterização de fenótipos regulados por *QS*, mas não propiciam um bloqueio definitivo da síntese da molécula sinalizadora, já que concentrações de inibidores, lactonase e acilases podem ser insuficientes para interferir na atuação das moléculas sinais.

Uma das maneiras mais diretas de descobrir qual a função de um gene é observar o que acontece ao organismo quando o gene é perdido. Estudar linhagens mutantes que adquiriram alterações ou supressões na sequência de nucleotídeos é uma prática consagrada em biologia. Como as mutações podem interromper os processos celulares, os mutantes frequentemente têm a chave para o entendimento da função do gene (ALBERTS *et al.*, 2004).

O número de aplicações biotecnológicas envolvendo microrganismos geneticamente modificados vem crescendo juntamente com a necessidade de aprimorar as técnicas genéticas, uma vez que estes novos microrganismos devem ser controlados sob condições estáveis estabelecidas e apresentarem seleção diferenciada (HERRERO *et al.*, 1990). Diferentes estratégias de mutagenese ao acaso e sítio direcionada têm sido adotadas para se obter mutantes deficientes em algum componente do mecanismo de *QS*.

Mutantes no gene *swrA* que codifica molécula sinalizadora de *QS* em *Serratia liquefaciens* MG1 obtido por mutagênese ao acaso com transposon, não apresentaram motilidade tipo espalhamento como o selvagem, indicando que este fenótipo é regulado por *QS* (LINDUM *et al.*, 1998).

Swift *et al.* (1999) inativaram o gene *ahyI* de *Aeromonas hydrophila* por meio de mutação sítio-dirigida, clonando-se o gene *ahyI* interrompido com o gene que confere resistência a canamicina, ao vetor suicida pKNG101. O fenótipo do mutante deficiente em AHL (C4-HSL) foi diferente da estirpe selvagem, apresentando menor, ou expressão basal, de exoproteases.

Mutantes AHL-negativo de *Serratia proteamaculans*, de mutação ao acaso, obtidos pelo uso do sistema de entrega pUT mini-Tn5 por meio de conjugação triparental, demonstraram que o mecanismo de *QS* dessa bactéria controla a deterioração do leite, uma vez que esses mutantes não coagularam o leite após 18 horas de incubação a temperatura ambiente, diferente da estirpe selvagem (CHRISTENSEN *et al.*, 2003).

A deterioração de carnes por *H. alvei*, mediada por *QS*, também pôde ser comprovada por meio da obtenção de mutantes AHL-negativos, obtidos por mutação ao acaso do gene *hall* e que apresentaram menor síntese de proteases associadas com a deterioração (BRUHN *et al.*, 2004).

O envolvimento de molécula sinal de *QS* bacteriano na deterioração de broto de feijão também foi comprovado por inativação do *geneI* de *Pectobacterium*, por meio de mutação ao acaso com o transposon Tn10. Quando comparado à estirpe selvagem, o mutante reduziu, significativamente, a atividade das enzimas proteases e pectinases (RASH *et al.*, 2005).

2.3. Importância do conhecimento do mecanismo de *QS* para microbiologia de alimentos

Os alimentos representam sistemas microbianos complexos com uma microbiota susceptível a várias condições de estresse e mudanças ambientais que ativam a expressão de genes (ARCHER, 1996).

Alguns estudos encontrados na literatura questionam se a presença de moléculas de AHL poderia implicar na regulação de fenótipos importantes na deterioração de alimentos (GRAM *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 2003). Concentrações elevadas dessas moléculas sinalizadoras foram detectadas em alimentos industrializados e associadas com a presença de deterioradores pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (GRAM *et al.*, 1999; GRAM *et al.*, 2002; FLODGAARD *et al.*, 2003). Muitos gêneros da família *Enterobacteriaceae* como *Enterobacter*, *Yersinia*, *Erwinia* e *Serratia*, são capazes de produzir AHLs e possuem genes regulados pelo sistema *QS* (JONES *et al.*, 1993; EBERL *et al.*, 1996; GRAM *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 2003; ATKINSON *et al.*, 2006)

Gram *et al.* (1999) constataram a produção de 3-oxo-N-hexanoil-homoserina lactona e de algumas moléculas análogas em 116 das 154 estirpes de enterobactérias psicrotróficas isoladas de salmão defumado ou carne embalada a vácuo, em condições comumente encontradas em alimentos, como temperatura de refrigeração, concentrações elevadas de sal e atmosfera contendo N₂. Quando a carne a vácuo foi inoculada com as estirpes de *H. alvei* selvagem ou mutante para a produção de

molécula sinalizadora, C6-oxo-HSL, não foi observada diferença na deterioração do produto (BRUHN *et al.*, 2004). Entretanto, quando *H. alvei* selvagem foi co-inoculada em leite com a estirpe deficiente na produção de AHL *S. proteamaculans* AC1, cuja produção de protease é regulada pelo *QS*, ocorreu a deterioração do produto, o que mostrou que *H. alvei* pode induzir fenótipos relevantes em outras bactérias no mesmo ambiente (BRUHN *et al.*, 2004).

O mecanismo de *QS* também foi identificado em bactérias como *Aeromonas*, contaminantes de produtos alimentícios mantidos sob temperaturas de refrigeração, que podem produzir AHL e induzir diferentes funções fisiológicas como fatores de virulência, motilidade e formação de biofilmes (MARTÍNEZ *et al.*, 2006). Pinto *et al.* (2007) detectaram a produção de AHL por bactérias psicrotróficas Gram-negativas isoladas do leite cru refrigerado, indicando que o mecanismo de *QS* pode desenvolver papel importante na deterioração deste produto. A regulação mediada por *QS* é vantajosa para bactérias já que é uma forma econômica de produzir fatores extracelulares somente depois de ser atingida uma alta densidade populacional (PARSEK e GREENBERG, 2000).

A capacidade de manipular o comportamento da regulação gênica em função da densidade populacional tem muitas vantagens, pois conhecer o mecanismo de comunicação entre as bactérias permite melhor compreensão da regulação de deterioração de alimentos. Estudos nessa área irão contribuir para elucidar a função das AHLs na deterioração dos alimentos por microrganismos, já que pouco se sabe da temperatura de estabilidade destes compostos e se condições de processamento e estocagem podem influenciar no tipo, quantidade e biodisponibilidade de AHLs em alimentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Genética de Microrganismos, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, e de Microbiologia de Alimentos e de Patógenos Alimentares do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa - Minas Gerais.

3.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo

As estirpes bacterianas psicrotróficas das espécies *H. alvei* e *E. cloacae* isoladas do leite cru refrigerado granelizado (PINTO, 2004) e outras bactérias usadas no presente trabalho estão listadas na Tabela 1.

O estoque das culturas foi feito em caldo Luria Bertani (LB) (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,4%) pH 7,4, contendo 33% de solução de glicerol 50% em água esterilizada e congelado a -80 °C. Antes de cada experimento, as células foram reativadas em caldo LB ou caldo LB acrescido do antibiótico específico, quando necessário, com incubação a 30 °C, por 18 horas.

Tabela 1- Estirpes bacterianas e plasmídeos usados nesse trabalho.

<i>Estirpe</i>	<i>Plasmídeo</i>	<i>Característica Relevante</i>	<i>Resistência</i>	<i>Fonte</i>
<i>H. alvei</i> 068	pMLM	nd ¹	---	Pinto (2004)
<i>H. alvei</i> 071	pMLM	nd ¹	---	Pinto (2004)
<i>E. cloacae</i> 067	---	---	---	Pinto (2004)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	pMLBAD-aiiA-Gm	doadora	Gentamicina (25 µg mL ⁻¹)	Martins (2007)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	pQE30-Xa- <i>halI068</i>	Expressa AHL de <i>H.alvei</i> 068	Ampicilina (100 µg mL ⁻¹)	Martins (2007)
<i>E. coli</i> SY327 λpir	pGP704	doadora (vetor suicida)	Ampicilina (100 µg mL ⁻¹)	Giskov (1998)
<i>E. coli</i> CC118 λpir	pUT-tn5-Km	doadora	Canamicina (50 µg mL ⁻¹)	Herrero <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> ER2925	---	dam ⁻	---	Cedido pela Universidade de Cornell - EUA
<i>E. coli</i> DH5α	pQE30-Xa- <i>halI068</i> -Gm	doadora	Gentamicina (25 µg mL ⁻¹)	Estoque do laboratório Este trabalho
<i>E. coli</i> DH5α			Ampicilina (100 µg mL ⁻¹)	
<i>E. coli</i> SY327 λpir	pGP704- <i>halI068</i> - Gm	doadora	Gentamicina (25 µg mL ⁻¹) Ampicilina (100 µg mL ⁻¹)	Este trabalho
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	---	monitora	---	Estoque do laboratório

¹ nd = não determinado

3.2. Caracterização fisiológica das bactérias

As culturas de *H. alvei* 068, 071, *E. cloacae* 067, *E. coli* CC118 λ pir e *C. violaceum* CV026 foram submetidas a testes morfo-tintoriais, bioquímicos e de sensibilidade a antibióticos. Foram observadas preparações microscópicas com coloração de Gram, verificada a motilidade em ágar SIM, realizadas provas bioquímicas do IMViC, onde foram avaliadas a produção de indol, de ácidos, com o indicador vermelho de metila, de acetilmetilcarbinol, pelo teste de Voges Proskauer e a utilização do citrato. A formação de colônias típicas nos meios diferenciais ágar MacConkey e ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) foi observada.

A determinação da resistência a antibióticos foi feita pela avaliação da Concentração Mínima Inibitória (MIC), utilizando o método da diluição dos antimicrobianos em meio líquido (Tabela 2), segundo Moreira (2005).

O teste foi conduzido com culturas reativadas em caldo LB e incubadas a 30 °C, durante 16 a 18 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000 g por 5 min (Sorvall RC5C, rotor SS34), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com tampão fosfato pH 7,0. Após este procedimento, as células foram ressuspensas em 5 mL de caldo LB. Ao atingirem absorvância líquida de 0,3 em comprimento de onda (λ) de 600 nm (Spectromete 20D, Milton Roy), as células foram diluídas em caldo LB até atingirem concentração de 10^5 UFC mL⁻¹. O controle para leitura no espectrofotômetro foi o caldo LB não inoculado. Em seguida, 230 μ L da cultura diluída foram adicionados aos poços da placa de microtitulação (Nunc-Immuno™ plates, Dinamarca), juntamente com o antimicrobiano, nas diferentes concentrações, em um total de 300 μ L por poço. As placas de microtitulação foram previamente esterilizadas por exposição à radiação ultravioleta, em λ de 270 a 300 nm, por 30 min.

O crescimento das bactérias psicrotróficas foi acompanhado em aparelho leitor de ELISA (Titertek Multiskan®, Plus-MkII), com leituras feitas em intervalos pré-estabelecidos. A MIC foi considerada como a menor concentração do antimicrobiano que impedia o crescimento bacteriano até duas horas após o tempo correspondente ao início da fase estacionária da cultura controle, que consistiu da bactéria cultivada em caldo LB, sem o antimicrobiano.

Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e o experimento foi repetido duas vezes.

Tabela 2 - Concentrações de antimicrobianos utilizadas na determinação da MIC.

Antimicrobianos	Gentamicina Tetraciclina Ácido Nalidíxico	Canamicina Estreptomicina	Ampicilina
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	20	45	95
	25	50	100
	30	55	105
	35	60	110

3.3. Obtenção de células eletrocompetentes de *H. alvei* e *E. cloacae*

Um protocolo para obtenção de células eletrocompetentes foi modificado para *H. alvei* 068 e 071 e *E. cloacae* 067. As células foram cultivadas em 50 mL de caldo LB a 30 °C durante, aproximadamente, 12 horas. Dessas culturas, 5 mL foram utilizados para inocular 250 mL de meio LB, seguindo-se de incubação sob agitação de 180 RPM até atingir absorvância a 600 nm (Spectrome 20D, Milton Roy) de 0,5. A cultura foi resfriada sob agitação, para temperatura próxima de 0 °C. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 4000 g (Sorvall RC5C, rotor GSA), por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos de centrífuga foram invertidos para maior eliminação do meio de cultura. Uma nova suspensão de células foi feita com 100 mL de água Milli-Q a 4 °C, seguida por centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes. O sedimento foi então ressuspensionado em 10 mL de água Milli-Q a 4 °C e centrifugado por 15 min a 3000 g (Sorvall RC5C, rotor SS34). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensionadas em 1,5 mL de glicerol 10% estéril gelado. Este procedimento resultou em células eletrocompetentes que foram submetidas à eletroporação em cubetas de 0,2 cm, sob 25 μF de capacitância e resistência de 200 Ω , segundo recomendações do fabricante (Bio Rad) ou estocadas a -80°C para uso posterior.

3.4. Construção de vetores

3.4.1. Clonagem e expressão do gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase

A extração de DNA plasmidial foi realizada por meio do kit *Gene JetTM Plasmid Miniprep* (Fermentas Life Sciences) da estirpe *E. coli* XL1-Blue pMLBAD-aiiA-Gm^r obtida por MARTINS (2007). O gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os pares de oligonucleotídeos Gem-D (5' ATT TGA TCA GAA CCT GAA TCG CCA GCG G 3') e Gem-R (5' ATT TGA TCA GTT GAA CGA ATT GTT AGG TGG C 3'). O sítio de restrição de *Bcl*I introduzido está sublinhado. Para as reações de amplificação foi utilizado aparelho termociclador Perkin-Elmer, modelo 9600 (Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C, 3 min, seguida de 40 ciclos constituídos por: uma etapa de desnaturação a 94 °C, 1 min, uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos a 55 °C, 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C, 1 min. Posteriormente, foi realizada uma última etapa de extensão a 72 °C, 4 min. O amplificado foi purificado utilizando o kit *Wizard[®] clean-up system* (Promega A7280), e posteriormente, ligado ao vetor pGEM[®]-T Easy (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Esta construção foi utilizada para transformar *E. coli* DH5 α . Os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo 25 μ g mL⁻¹ de gentamicina. A confirmação da construção foi obtida por PCR de colônia dos transformantes resistentes à gentamicina, utilizando as mesmas condições para amplificação do gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase, porém com uma etapa inicial de desnaturação prolongada, a 94 °C, 10 min. A construção também foi confirmada por meio de clivagem do DNA plasmidial com enzima de restrição *Eco*RI (Promega) seguida por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

3.4.2. Inativação do gene *hall68* pela integração do gene que confere resistência a gentamicina

Duas estratégias foram adotadas para a inativação do gene *hall68*. A primeira consistiu na interrupção do gene *hall68* clonado no plasmídeo pQE30-Xa-*hall68* (Figura 5) com o gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase. Para alcançar este objetivo, foi realizada a extração de DNA plasmidial por meio do kit *Gene JetTM Plasmid Miniprep* (Fermentas Life Sciences) da estirpe *E. coli* XLI Blue pQE30-Xa-*hall68*. Esse vetor foi utilizado na transformação de *E. coli* ER2925, estirpe Dam⁻. Os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA plasmidial e finalmente, a clivagem do mesmo com a enzima *BclI* (Promega), resultando portanto, em pQE30-Xa-*hall68/BclI*.

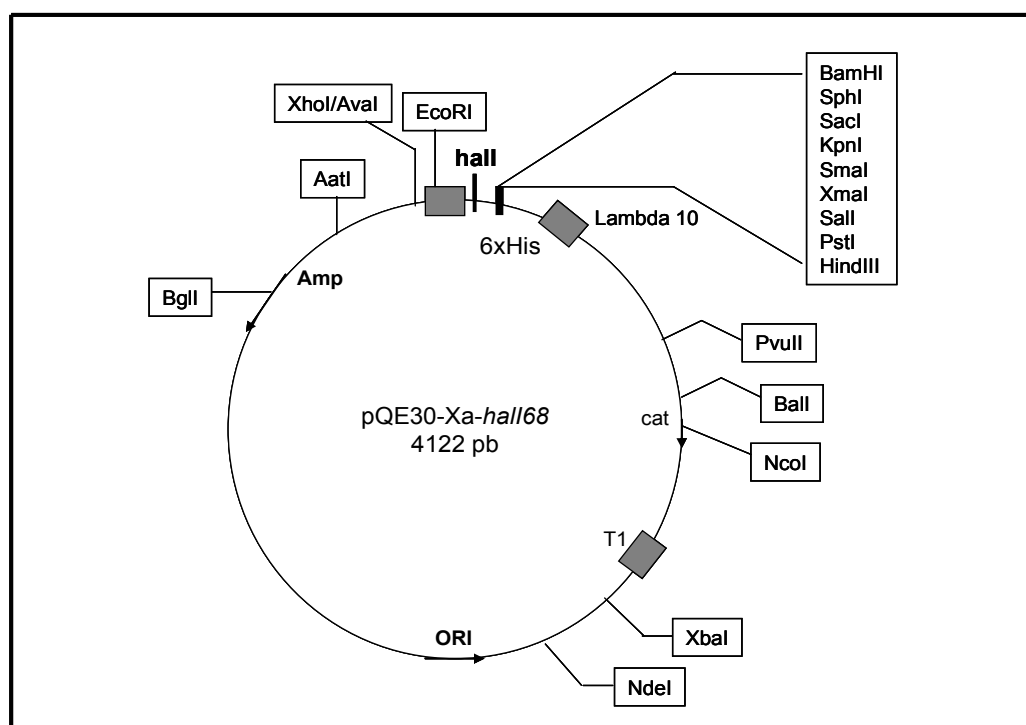


Figura 5 – Mapa de restrição do vetor pQE30 contendo o gene *hall*, construído por Martins (2007).

O fragmento de DNA amplificado anteriormente que corresponde ao gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase foi digerido com *Bcl*I e ligado no vetor pQE30-Xa-*halI68/Bcl*I, resultando no vetor pQE30-Xa-*halI68::Gm^r*, que apresenta gene de *halI68*, interrompido na posição 276 pb pelo gene que confere resistência a gentamicina, de 872 pb. Esta nova construção foi utilizada para transformar *E. coli* DH5 α . Colônias dos transformantes resistentes a gentamicina foram selecionadas em ágar LB contendo 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico e submetidas a PCR para a confirmação da interrupção do gene *halI68*. Para a amplificação utilizaram-se os oligonucleotídeos *halIEco*RID (5' ATT GAA TTC TAC ACC AAT GCA GTC TTA ATT 3') e *halIEco*RIF (5' ATT GAA TTC ATG CTT GAA CTA TTT GAT GTC 3'), onde os sítios de restrição para enzima *Eco*RI estão sublinhados. Para a amplificação foi utilizado o aparelho termociclador Perkin-Elmer, modelo 9600 (Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação foram definidos como uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C, 10 min, seguida de 40 ciclos definidos por: uma etapa de desnaturação a 94 °C, 1 min, uma etapa de anelamento a 52 °C, 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C, 1 min. Posteriormente, foi realizada uma última etapa de extensão a 72 °C, 4 min. O DNA amplificado, contendo 1.532 pb, foi purificado, utilizando o kit *Wizard[®] clean-up system* (Promega A7280), submetido à restrição com *Eco*RI (Promega) e ligado no vetor pGP704/*Eco*RI (Figura 6), resultando em pGP704-*halI68::Gm^r*. Esta construção final foi transferida para as estirpes 068 e 071 de *H. alvei* e *E. cloacae* 067, por eletroporação e para *E. coli* SY372, por metodologia baseada em choque térmico (SAMBROK *et al.*, 1989).

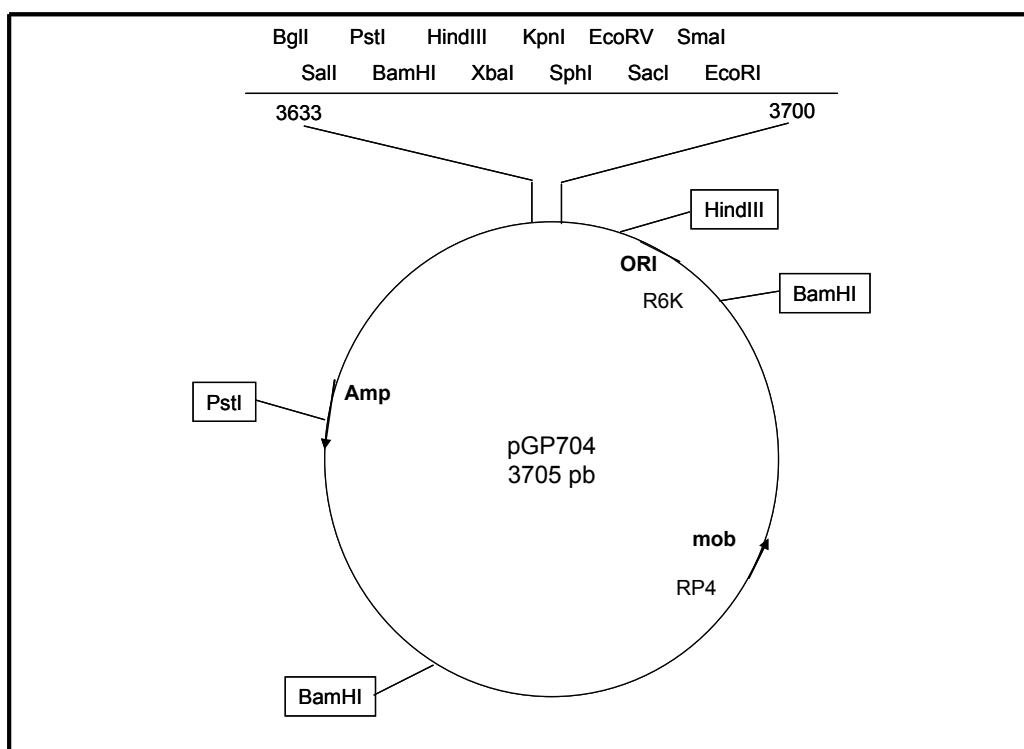


Figura 6 – Mapa de restrição do vetor pGP704 usado para avaliar a expressão do gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase.

A segunda estratégia objetivou a inativação do gene *hall68* clonado no vetor suicida pGP704. Para tanto, o gene *hall68* amplificado a partir do DNA do vetor pQE30-Xa-*hall68* por meio dos oligonucleotídeos *hallEcoRID* e *hallEcoRIF* foi ligado a pGP704, previamente clivado com *EcoRI*, resultando em pGP704-*hall68*. Esse vetor foi utilizado na transformação de *E. coli* ER2925. Transformantes resistentes à ampicilina foram selecionados em ágar LB contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico, seguindo-se a extração de DNA plasmidial e, finalmente, feita a restrição com enzima *BclI*. O amplificado conforme descrito acima, que codifica gentamicina-3-acetiltransferase foi digerido com *BclI* e ligado neste vetor, resultando em pGP704-*hall68*::Gm^r.

3.5. Clivagem do vetor suicida pGP704

A caracterização do vetor suicida usado nas várias etapas da construção foi feita por clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Bgl/II* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6. Obtenção de mutantes *hallI*

Foi realizada misturas de cada estirpe de todos os transformantes obtidos após eletroporação com pGP704*hallI*068::Gm. A mistura de cada estirpe transformada, *H. alvei* 068 e 071e *E. cloacae* 067, foi submetida ao protocolo de células eletrocompetentes como descrito anteriormente. Uma nova eletroporação com vetor pUTminiTn5Km, utilizando o sistema de incompatibilidades de vetores pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade, IncX. A seleção dos transformantes foi feita por plaqueamento em superfície de ágar LB contendo 50 µg mL⁻¹ de canamicina e 25 µg mL⁻¹ de gentamicina. Os transformantes obtidos foram transferidos para ágar LB contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina ou 50 µg mL⁻¹ de canamicina ou 25 µg mL⁻¹ de gentamicina.

3.7. Confirmação da mutação no gene *hallI*

Para selecionar potenciais mutantes no sistema *QS*, os transconjugantes obtidos foram avaliados no teste de indução da estirpe monitora *C. violaceum* CV026. Foram feitas estrias paralelas dos transformantes e do monitor na superfície de ágar LB e, após incubação por 12 horas a 30 °C, a produção do pigmento violaceína pela monitora *C. violaceum* CV026 foi observada. A estirpe *C. violaceum* CV026 é um mutante deficiente na produção de AHL e a produção do pigmento violaceína é regulada pelo sistema *QS*. Porém, na presença de AHL exógena de cadeias laterais de quatro a oito carbonos, a produção de violaceína é observada pela pigmentação roxa das colônias. Estirpes selvagens de *H. alvei* e *E. cloacae* são capazes de induzir a produção de violaceína em *C. violaceum* e, a não indução da pigmentação foi considerada como resultado positivo para a inativação do gene *hallI* nas estirpes transformantes obtidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das estirpes de *H. alvei* e *E. cloacae*

Os resultados dos testes bioquímicos do IMViC das espécies *H. alvei* e *E. cloacae* selecionadas para a condução deste estudo encontram-se na Tabela 3. Conforme descrito por Stiles e Ng (1981), os testes bioquímicos de IMViC são importantes para diferenciar as bactérias entéricas de natureza patogênica ou não, que podem estar presentes como contaminantes da água e dos alimentos.

Tabela 3- Resultados dos testes bioquímicos de IMViC das estirpes de *H. alvei*, *E. cloacae*, *E. coli* e *C. violaceum*

Teste	Indol	Vermelho de Metila	Voges Proskauer	Citrato de Simons
<i>H. alvei</i> 068	-	+	+	+
<i>H. alvei</i> 071	-	+	+	+
<i>E. cloacae</i> 067	-	+	+	+
<i>E. coli</i> CC118 λpir	+	+	-	-
<i>C. violaceum</i> CV 026	-	-	-	-

A produção de ácido a partir da lactose no ágar MacConkey confirma a característica fermentadora dessas espécies. Bacilos Gram-negativos que fermentam a lactose diminuem o pH do meio, dado pelos subprodutos ácidos, produzindo colônias róseas (FLOURNOY *et al.*, 1990). A morfologia das colônias em ágar EMB foi característica, permitindo a diferenciação de *H. alvei* e *E. cloacae* de *E. coli*.

As estirpes bacterianas *H. alvei* 068 e 071 e *E. cloacae* 067 foram sensíveis a todas as concentrações testadas dos antimicrobianos. Os resultados encontrados diferem dos obtidos por Martins (2007), que constatou que esses mesmos isolados foram resistentes a 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Além disso, esse mesmo autor verificou resistência das estirpes 068 e 071 de *H. alvei* e de 067 de *E. cloacae* a 20 µg mL⁻¹ de cloranfenicol. A sensibilidade de bactérias entéricas Gram-negativas a gentamicina foi confirmada por Kadurugamuwa *et al.* (1993) que sugeriram dois potenciais efeitos letais deste antimicrobiano que promoveriam a inibição da síntese de proteínas e ação na superfície celular.

4.2. Construção de vetores

4.2.1. Clonagem e expressão do gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase

A constatação de que o gene que confere resistência à gentamicina estava sendo expresso foi feita a partir da inserção do mesmo no vetor pGEM®-T Easy. A liberação do fragmento de DNA que corresponde ao gene ocorreu quando a construção obtida foi clivada com *EcoRI*, liberando fragmento de 3015 pb correspondente ao plasmídeo e 872 pb correspondente ao gene de interesse (Figura 7). As estirpes de *E. coli* DH5α transformadas com este plasmídeo foram resistentes a 25 µg mL⁻¹ de gentamicina. As colônias transformantes foram avaliadas por PCR e um fragmento de tamanho esperado foi obtido, confirmando a presença do gene que codifica a gentamicina-3-acetiltransferase (Figura 8).

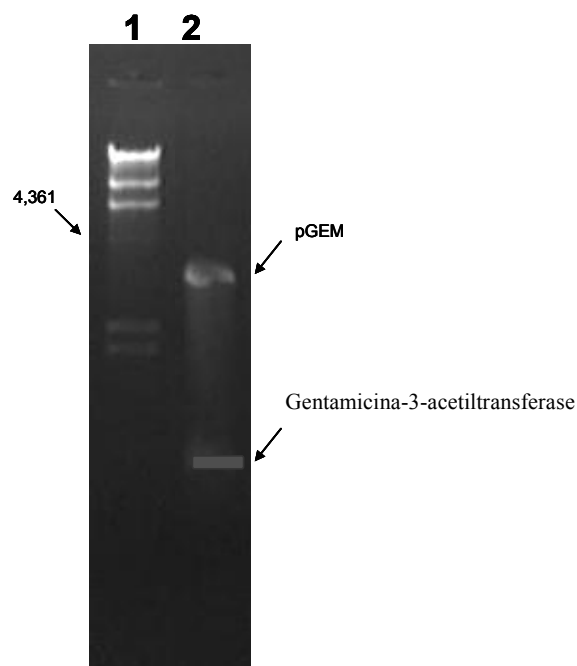


Figura 7 – Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% da restrição de pGEM®-T Easy-GM contendo o gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase. Canaleta 1, marcador λ /HindIII; Canaleta 2, pGEM®-T Easy-GM clivado com *Eco*RI.

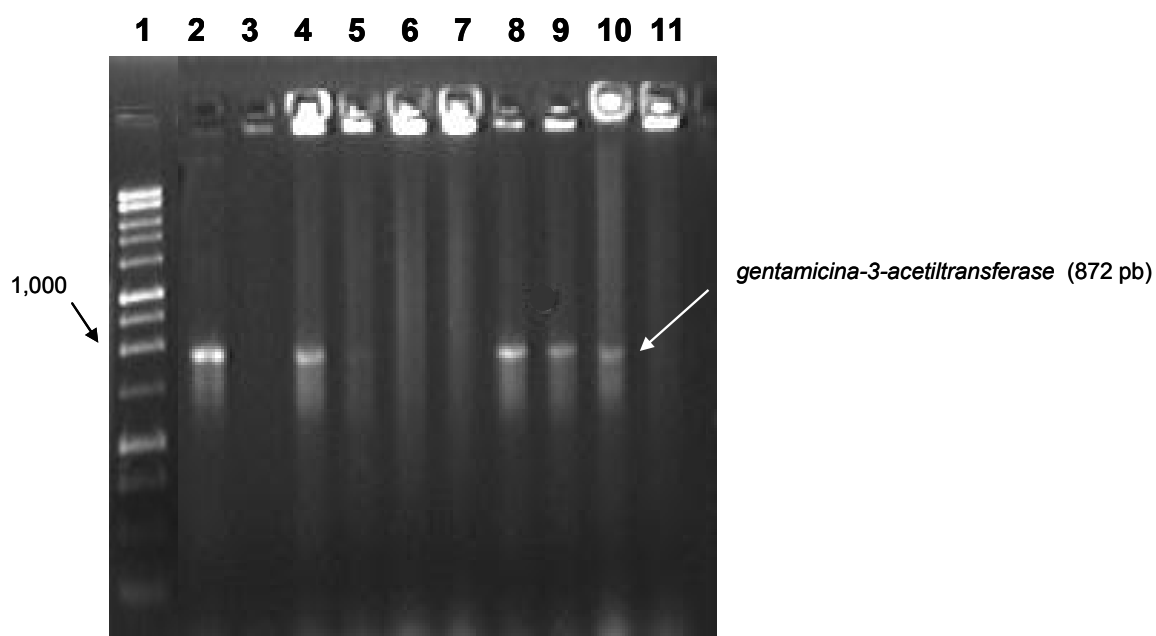


Figura 8 - Análise, por eletroforese em gel de agarose 0,8%, dos fragmentos de DNA obtidos da amplificação do gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase, clonado no vetor pGEM®-T Easy. Canaleta 1, marcador DNA Ladder 1Kb; Canaletas 2 a 11, amplificação das linhagens transformantes.

4.2.2. Inativação de *halI* com o gene que confere resistência à gentamicina

Com o objetivo de obter *halI* interrompido com o gene que confere resistência à gentamicina, a estirpe de *E. coli* ER2925 foi transformada com pQE30-Xa-*halI68*. A utilização dessa estirpe foi necessária para a multiplicação do vetor pQE30-Xa-*halI68*, previamente à clivagem com a enzima *BclI*. As enzimas Dam metilase e *BclI* possuem o mesmo sítio de clivagem, GATC. Porém, a metilação da adenina feita pela metilase impede a restrição por *BclI*, justificando a necessidade da hospedeira *E. coli* ER2925 na propagação do plasmídeo de interesse (SNYDER, 2003).

A confirmação da presença do vetor pQE30-Xa-*halI68* em *E. coli* ER2925 foi feita pela amplificação do gene *halI068* seguida por análise eletroforética, onde foi observado o produto de tamanho esperado de 660 pb (Figura 9). Este resultado está de acordo com as informações de Martins (2007), que sequenciou o gene estrutural de *halI68* de 660 pb.

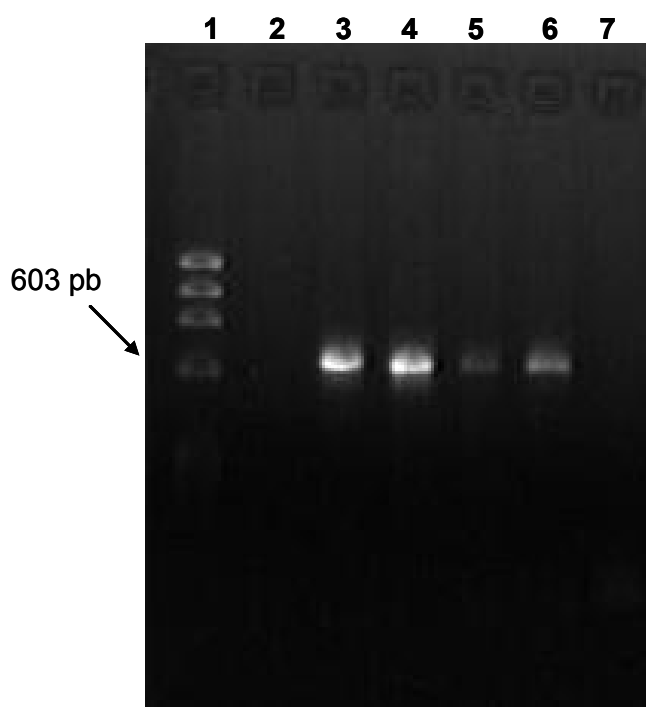


Figura 9 – Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5%, do fragmento de DNA obtido da amplificação do gene *halI068* clonado em pQE30-Xa-*halI68*. Canaleta 1, marcador Φ X174/*HaeIII*; Canaletas 2 a 7, *E. coli* ER2925 transformantes.

A comprovação da interrupção de *hall68* com o gene que confere resistência à gentamicina foi feita pela seleção de colônias em ágar LB contendo 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicina. Entretanto, não foi possível confirmar esta construção por PCR e por essa razão, outra estratégia para a interrupção do gene *hall68* foi adotada.

A segunda estratégia baseou-se na clonagem do gene *hall68* no vetor suicida pGP704, seguida de interrupção com o gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase, gerando o plasmídeo pGP704*hall68*::Gm. Os transformantes de *H. alvei* 068 e 071 e *E. cloacae* 067 obtidos com o plasmídeo pGP704*hall68*::Gm foram capazes de crescer em meio LB contendo 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. O DNA plasmidial foi extraído e usado para amplificar o gene *hall68* interrompido. Um fragmento de 1500 pb foi observado em gel de agarose, confirmando o sucesso da construção (Figura 10).

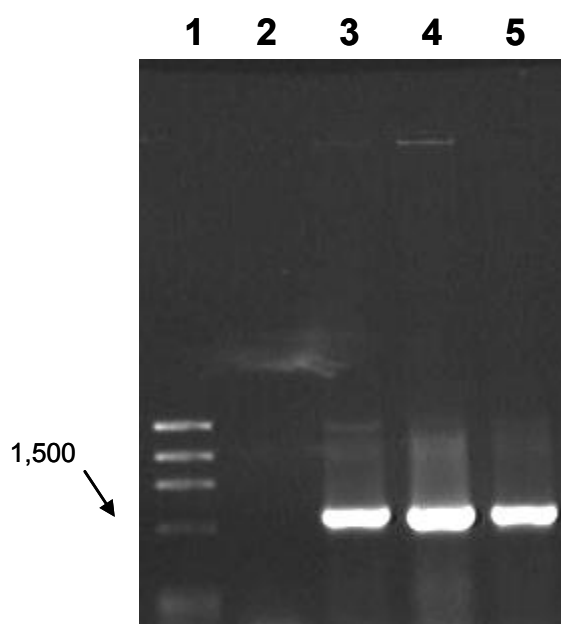


Figura 10 – Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5%, do fragmento de DNA amplificado do plasmídeo pGP704*hall68*::Gm^r dos transformantes de *H. alvei* 068 e 071 e *E. cloacae* 067. Canaleta 1, λ /PstI; Canaleta 2, branco; Canaleta 3, transformante de *E. cloacae* 067; Canaleta 4, transformante de *H. alvei* 068 e Canaleta 5, transformante de *H. alvei* 071.

Em etapas seguintes os transformantes foram analisados quanto à capacidade de induzir a produção de violaceína pela estirpe monitora *C. violaceum*. Entretanto, o pigmento continuou a ser produzido, indicando que o gene *halI68* no genoma de *H. alvei* 068 e 071 e *E. cloacae* 067 continuava a ser expresso (Figura 10). Estes resultados sugeriram que não houve recombinação entre o vetor pGP704*halI68*::Gm^r e o gene *halI68* presente no genoma.

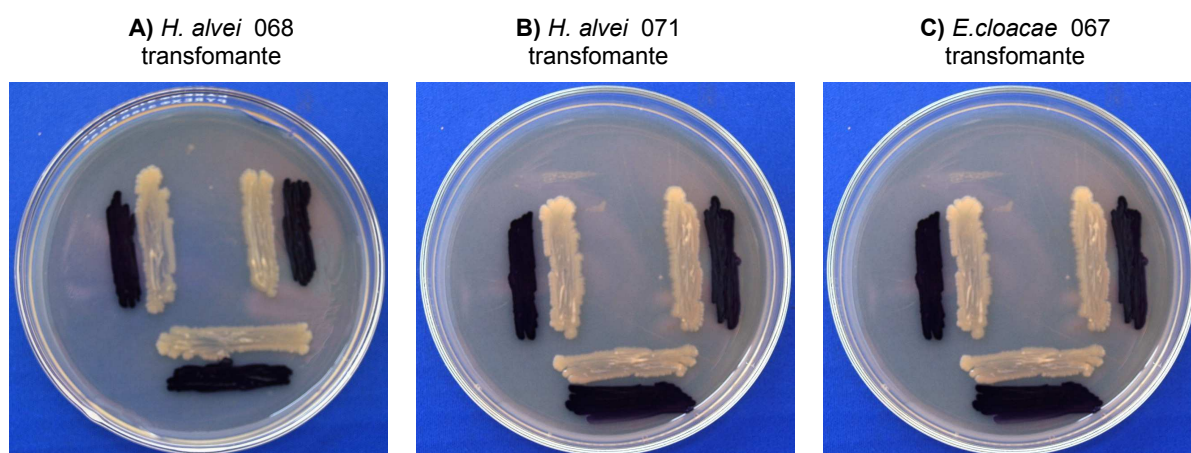


Figura 11 – Ativação da produção de pigmento violaceína pela estirpe *C. violaceum* CV 026, monitora de AHL, pela técnica de estrias paralelas em ágar LB pelos transformantes de A) *H. alvei* 068 B) *H. alvei* 071 e C) *E. cloacae* 067

O vetor pGP704, usado para a interrupção do gene *halI*, foi construído por Miller *et al.* (1988) que objetivaram a criação de um novo vetor suicida para a realização de mutações sítio dirigidas. O pGP704 foi originado do vetor pRK703 que apresenta origem de replicação R6K e também contém genes *mob*, originados do vetor RP4 que confere ao mesmo uma origem de transferência conjugativa (*OriT*) podendo, desta forma ser transferido para uma variedade de estirpes bacterianas Gram-negativas (MILLER *et al.*, 1988). O princípio do mecanismo suicida é a inserção do vetor em estirpes que não sintetizam a proteína π , necessária para a replicação da origem R6K. Essa estratégia foi utilizada pelos mesmos pesquisadores para silenciar o gene *toxR* de *Vibrio cholerae*. A inserção do vetor contendo o gene

toxR em estirpes de *V. cholerae* resultou em mutantes *toxR*⁻ devido a recombinação homóloga.

Herrero *et al.* (1990) também obtiveram sucesso ao utilizar o vetor suicida pGP704 contendo o gene que confere resistência a canamicina em *Pseudomonas putida* e para a mutação sítio dirigida do gene que codifica a produção de melanina, isolado de *Streptomyces antibioticus*, em estirpe de *Klebsiella pneumoniae*.

A estratégia do uso de vetor suicida também foi adotada por Swift *et al.* (1999) para inativação do gene *ahyI*, responsável pela síntese de AHL em *A. hydrophila*. A transferência do vetor às estirpes de interesse ocorreu por conjugação biparental e a seleção dos mutantes foi feita por aquisição de resistência a antibióticos e pelo ensaio de indução da estirpe monitora *C. violaceum* CV026. Os mutantes selecionados foram submetidos à análise por hibridização e foi comprovada a recombinação homóloga do vetor suicida.

O fato do vetor pGP704, reconhecido como suicida, ter permanecido livre e replicando nos transformantes obtidos neste trabalho pode ser explicado pelo mecanismo de replicação de R6K, que contém três origens de replicação α , β e γ , conforme demonstrado por Flashner e Shafferman (1990). As origens α e β são usadas com frequência similar *in vivo*, enquanto que a origem γ geralmente é silenciada. Cada origem é ativada por uma proteína π iniciadora específica de R6K, codificada pelo gene *pir*. A proteína π é essencial para iniciação da replicação em trans nas origens α e β , e pode apresentar duas formas: monômeros, que ativam a replicação e dímeros, que inibem a replicação. Na forma de dímeros também se liga a seqüências repetidas e invertidas da região reguladora bloqueando a transcrição do gene *pir* (KUNNIMALAIYAAN *et al.*, 2007). Estudos realizados por Wu *et al.* (1995) demonstraram que, ao silenciar as origens α e β , a origem γ pode manter-se estável quando a proteína π está ausente ou em baixas concentrações e que, altas concentrações desta proteína resultam em controle negativo da replicação. A estabilidade do plasmídeo suicida replicado pela origem γ foi atribuída ao sítio *stb* presente no sistema de replicação R6K. A regulação da replicação R6K também foi estudada por Shaffermant e Helisnki (1983) que demonstraram que a proteína π regula sua própria expressão, porém não é a única responsável pela frequência de iniciação da replicação do DNA de R6K.

Estudos com bactérias patogênicas receptoras de minireplicons ori V γ mobilizáveis de R6K em pFL129, que expressa a proteína π e pFL130, que não

expressa a proteína π , demonstraram que a mutação no gene *pir* resultou em aumento do número de cópias do vetor (GRUDNIAK e DOWJAT, 2007).

Portanto, a replicação do vetor suicida pGP704 no presente trabalho pode ser atribuído a ativação da origem de replicação γ , impedindo, desta forma, a manifestação da característica suicida desse vetor.

A comprovação da autenticidade do vetor pGP704 e das construções realizadas no mesmo, feita com as enzimas de restrição BglII e EcoRI, revelaram fragmentos de DNA de tamanhos esperados (Figura 12).

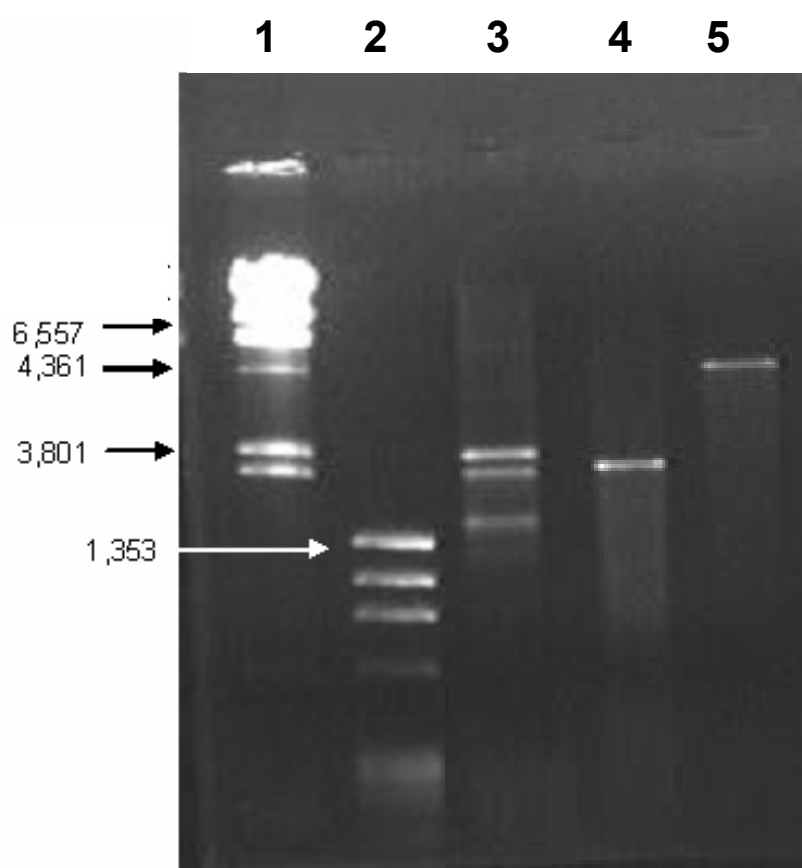


Figura 12 – Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%, da clivagem do DNA plasmidial com diferentes enzimas de restrição. Canaleta 1, Φ X174/*Hae*III; Canaleta 2, λ /*Pst*I; Canaleta 3, pGP704 clivado com *Eco*RI; Canaleta 4, pGP704 clivado com *Bgl*II e Canaleta 5, pGP704*hall68::Gm^R* clivado com *Bgl*II.

4.3. Obtenção de mutantes *HalI*⁻

O crescimento de transformantes de *H. alvei* 068 e 071 e *E. cloacae* 067 em ágar contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina indicou que um dos vetores pGP704*halI68*::Gm^r ou pUTminiTn5 recombinou (Figura 13). Por possuírem o controle do mecanismo de replicação R6K, estes vetores são agrupados, segundo Couturier *et al.* (1988), no grupo X de incompatibilidade. Considerando então que esses vetores são incompatíveis, não poderiam coexistir em uma mesma célula.

A confirmação de que ocorreu recombinação homóloga do gene *halI68* interrompido pelo gene que confere resistência à gentamicina com o gene *halI*, presente no DNA do cromossoma bacteriano, foi feita por meio da transferência de estirpes resistentes à canamicina e gentamicina para ágar contendo ampicilina. A ausência de crescimento dos transformantes em ampicilina sugeriu que *halI68* interrompido integrou no DNA cromossômico pois o plasmídeo pGP704 não permaneceu replicando nas bactérias transformadas (Figura 14).

A confirmação de fato, da interrupção do gene *halI* foi obtida quando os transformantes resistentes à canamicina e gentamicina não induziram a produção de violaceína em *C. violaceum* CV026 (Figura 15).

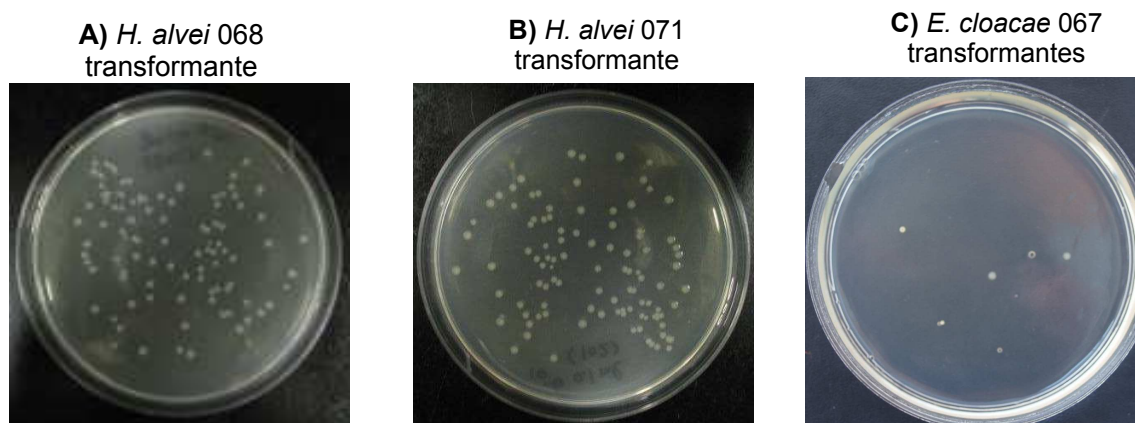
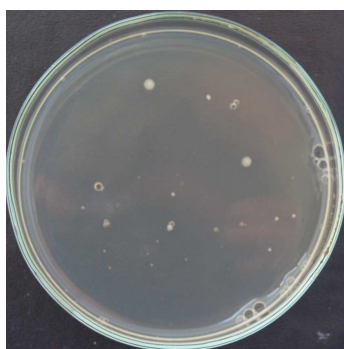
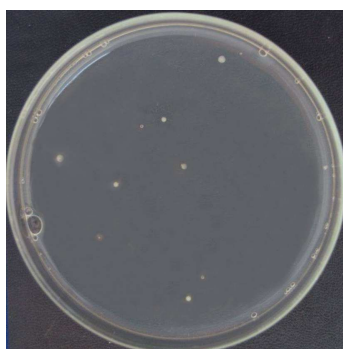


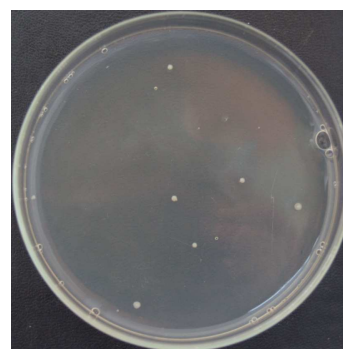
Figura 13 – Colônias obtidas por meio da transformação de *H. alvei* e *E. cloacae* contendo pGP704 *halI68*::Gm^r com pUTminiTn5Km em ágar LB contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina.



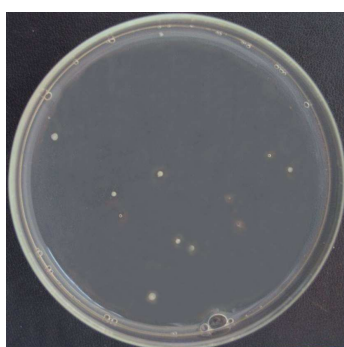
A) *H. alvei* 068 transformante



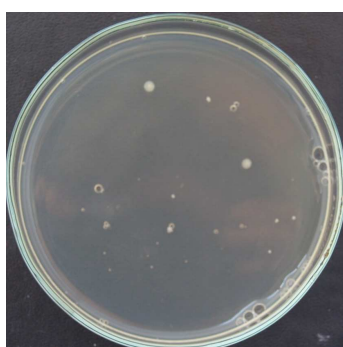
B) *H. alvei* 071 transformante



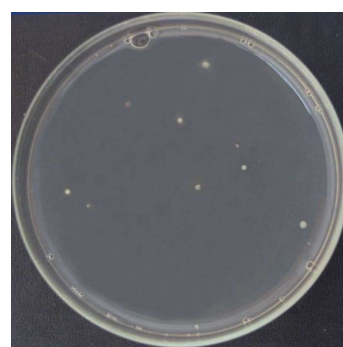
C) *E. cloacae* 067 transformante



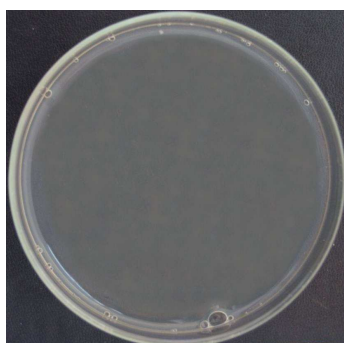
D) *H. alvei* 068 transformante



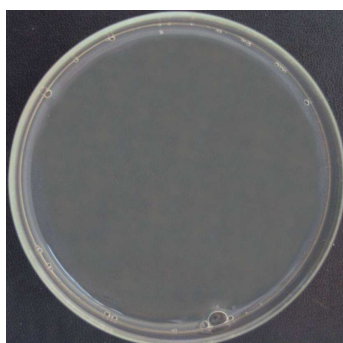
E) *H. alvei* 071 transformante



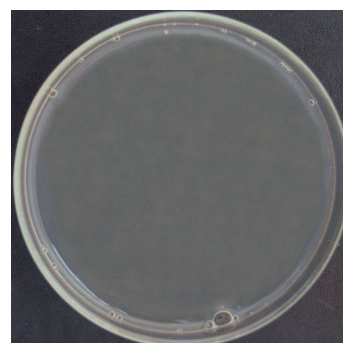
F) *E. cloacae* 067 transformante



G) *H. alvei* 068 transformante



H) *H. alvei* 071 transformante



I) *E. cloacae* 067 transformante

Figura 14 – Crescimento de transformantes com pGP704 *halI68::Gm* e pUTminiTtn5Km em ágar LB contendo 50 µg mL⁻¹ de canamicina (A a C); 25 µg mL⁻¹ de gentamicina (D a F) e em 100 µg mL⁻¹ de ampicilina (G a I).



A) Estirpes selvagens



B) *H. alvei* 068 Hall⁻



C) *H. alvei* 071 Hall⁻



D) *E. cloacae* 067 Hall⁻

Figura 15 - Sistema de detecção de produção de AHL por mutantes Hall⁻ com a estirpe monitora *C. violaceum* CV 026 que produz o pigmento roxo violaceína na presença de AHL em agar LB. A) Estirpes selvagens de *H. alvei* 068 e 071 e *E. cloacae* 067. B) Mutantes de *H. alvei* 068 C) Mutantes de *H. alvei* 071 e D) Mutantes de *E. cloacae* 067.

5. CONCLUSÕES

O gene *hall* e seu homólogo, responsável pela síntese da molécula sinal de *QS* em estirpes de *H. alvei* e *E. cloacae*, respectivamente, foi inativado por meio de recombinação do gene *hall* interrompido com o gene *hall* do cromossoma bacteriano, resultando na obtenção de mutantes Hall⁻.

O sistema de incompatibilidade de vetores foi eficiente para a obtenção desses mutantes e foi possível obter um protocolo para obtenção de células eletrocompetentes de bactérias Gram-negativas psicrotróficas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J. , RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 4 ed. Porto Alegre. Artmed, 2004, p.525.
- ARCHER, D.L. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptative mutations. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, p. 91-95, 1996.
- ATKINSON, S., CHANG, C. I., SOCKETT, E., CÁMARA, M., WILLIAMS, P. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1451–1461, 2006.
- BASSLER, B.L., WRIGHT, M., SHOWALTER, R.E., SILVERMAN, M.R. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. **Molecular Microbiology**, v.9, p. 773-786, 1993.
- BASSLER, B.L., WRIGHT, M., SILVERMAN, M.R. Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. **Molecular Microbiology**, v. 12, p. 403–412, 1994.
- BOTTOMLEY, M.J., MURAGLIA, E., CARFI, R.B., CARFI, A. Molecular insight into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.13592-13600, 2007.
- BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B., FLODGAARD, L.R., NIELSEN, K.F., LARSEN, T., GIVSKOV, M., GRAM, L. Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.4293-4302, 2004.

- CHEN, X., SCHAUDER, S., POTIER, N., VAN DORSSELAER, A., PELCZER, I., BASSLER, B.L., HUGHSON, F.M. Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. **Nature**, v.415, p.545-549, 2002.
- CHRISTENSEN, A. B., RIEDEL, K., EBERL, L., FLODGAARD, L. R., MOLIN, S., GRAM, L., GIVSKOV, M. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. **Microbiology**, v.149, p.471-483, 2003.
- COUTURIER, M. BEX, F. BERGQUIST, P., MASS, W. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiological Reviews**, v. 52, p. 375-395, 1988.
- DEFOIRDT, T.; BOON, N.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. **Aquaculture**. v.240, p. 69-88, 2004.
- DEGRASSI, G. AGUILAR, C., BOSCO, M., ZAHARIEV, S., PONGOR, S., VENTURI, V. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS 358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. **Current Opinion in Microbiology**. v. 45, p. 250- 254, 2002.
- DONG, Y.H., XU, J.L., LI, X.Z., ZHANG, L.H. AiiA, an enzyme that inactivates the acyl homoserine lactone quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 497, p. 4154-4158, 2000.
- DONG, Y.H., WANG, L.H., XU, J.L., ZHANG, H.B., ZHANG, X.F., ZHANG, L.H. Quenching quorum sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. **Nature**, v. 411, p.813-817, 2001.
- DONG, Y.H., GUSTI, A.R., ZHANG, Q., XU, J.L., ZHANG, L.H. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1754-1759, 2002.
- EBEHARD, A., WIDRING, C.A., MCBATH, P. SHINELLER, J.B. Analogs of the autoinducer of bioluminescence in *Vibrio fischeri*. **Archives of Microbiology**, v. 146, p. 35-40, 1986.
- EBERL L.; WINSON, M. K., STERNBERG, C., STEWART, S. A. B., CHRISTIANSEN, G., CHHABRA, S. R., BYCROFT, B., WILLIAM, P., MOLIN, S., GIVSKOV, M. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 1, p.127-136, 1996.
- FEDERLE, M.J., BASSLER, B.L. Interspecies communication in bacteria. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n.9, p. 1291-1298, 2003.

- FLASHNER, Y., SHAFERMAN, A., α and β replication of plasmid R6K show similar distortions of the DNA helix *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 9123-9127, 1990.
- FLETCHER, M. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 2027-2030, 1988.
- FLODGAARD, L.R., CHRISTENSEN, A.B., MOLIN, S., GIVSKOV, M., GRAM, L. Influence of food preservation parameters and associated microbiota on production rate, profile and stability of acylated homoserine lactones from food-derived Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.145-156, 2003.
- FUQUA, C., PARSEK, M.R., GREENBERG, E.P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review Genetics**, v. 35, p. 439-468, 2001.
- FUQUA, W. C., WINANS, S. C., GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: The *LuxR-LuxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 269-275, 1994.
- FLOURNOY, D.J., WONGPRADIT, S., SILBERG, S.L. Facilitating Identification of Lactose-Fermenting Enterobacteriaceae on MacConkey Agar. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**. v. 50. p. 5-8, 1990.
- GRAM, L., CHRISTENSEN, A.B., RAVN, L., MOLIN, S., GIVSKOV, M. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the Enterobacteriaceae isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3458-3463, 1999.
- GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B., GIVSKOV, M. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.79-97, 2002.
- GRAM, L.; CHRISTENSEN, A.B.; RAVN, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the Enterobacteriaceae isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3458-3463, 1999.
- GRUDNIAK, A.M., DOWJAT, A. K. Conjugal transfer of plasmid R6K γ ori minireplicons derivatives from *Escherichia coli* to various genera of pathogenic bacteria. **Current Microbiology**, v. 55, p. 549-553, 2007.

- HERRERO, M., DE LORENZO, V., TIMMIS, K.N. Transposon vectors containig no-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.6557-6567, 1990.
- HENTZER, M., WU, H., ANDERSEN, J.B., RIEDEL, K., RASMUSSEN, T.B., BAGGE, N., SCHEMBRI, M.A., SONG, Z., KRISTOFFERSEN, P. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 22, p. 3803-3815, 2003.
- HOLDEM, M. T. G., CHHABRA, S. R., deNYS, R., STEAD, P., BAINTON, N. J., HILL, P. J., MANEFIELD, M., KUMAR, N., LABATTE, M., ENGLAND, D., RICE S., GIVSKOV, M., SALMOND, G. P. C., STEWART, G. S. A. B., BYCROFT, B. W., KJELLEBERG, S., WILLIAMS. Quorum sensing cross-talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 33: p. 1254-1266, 1999.
- JONES, M.B., JANI, R., REN, D., WOOD, T.K., BLASER, M.J. Inhibition of *Bacillus anthracis* growth and virulence-gene expression by inhibitors of quorum-sensing. **Journal of Infection Disease**, v. 191, p 1881-1888, 2005.
- JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 347-348.
- KELLER, L., SURETTE, M. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews in Microbiology**, v.4, n. 4, p.248-258, 2006.
- KUNNIMALAIYAAN, S., RAKAWSKI, S.A., FILUTOWICZ, M. Structure-based functional analysis of plasmid R6K's replication protein: key amino acids at the π /DNA interface. **American Society for Microbiology**. Accepts, published online on 20 April 2007.
- LAZAZZERA, B.A., GROSSMAN, A.D. The ins and outs of peptide signaling. **Trends in Microbiology**, v. 6, n.7, p. 288-294, 1998.
- LEADBETTER, J.R., GREENBERG, E.P. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by *Variovorax paradoxus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 6921-6926, 2000.
- LIN, Y.H., XU, J.L., HU, J., WANG, L.H., ONG, S.L., LEADBETTER, J.R. ZHANG, L.H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 849-860, 2003.

- LINDUN, P.W., CHRISTOHERSEN, C., EBERL, L. MOLIN, S., GIVSKOV, M. *N*-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.6384-6388, 1998.
- MARTÍNEZ, M.S, UYTENDAELE, M., DEMOLDER, V., DEBEVERE, J. Influence of food system conditions on N-acyl-L-homoserine lactones production by *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**. V.112, p.244-252, 2006.
- MARTINS, M.L., PINTO, C.L.O., ROCHA, R.B., ARAÚJO, E.F., VANETTI, M.C.D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p. 144-148, 2006.
- MARTINS, M. L. **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quorum sensing em bactérias psicrófilas isoladas de leite.** 171p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- MILLER, V.L., MEKALANOS, J.J. A novel suicide vector its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins virulence determinants in *Vibrio cholera* requires *toxR*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.2575-2583, 1988.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.
- MILLER, M.B., SKORUPSKI, K., LENZ, D.H., TAYLOR, R.K., BASSLER, B.L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. **Cell**, v.110, p.303-314, 2002.
- MCDUGALD, D., RICE, S.A., KJELLBERG, S. Review: Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. **Anal Bioanal Chem**, V.387, p.445-453, 2007.
- MOREIRA, M.A.S., OLIVEIRA, J.A., TEIXEIRAS, L.M., MORAES, C.A., Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. **Veterinary microbiology**, v.109, p.75-81, 2005.
- NASSER, W., REVERCHON, S. New insight into the regulatory mechanisms of the LuxR family of *quorum sensing* regulators. **Anal Bioanal Chem**, v. 387, p.381-390, 2007.
- PARSEK, M.R., FUQUA, C. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4427-4440, 2004.

- PARSEK, M. R., GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8789-8793, 2000.
- PARSEK, M. R., GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n.1, p. 28-33, 2005.
- PASSADOR, L., TUCKER, K.D., GUERTIN, K.R., JOURMET, M.P., KENDE, A.S., IGLEWSKI, B.H. Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5995-6000, 1996.
- PESCI, E. C., MILBANK, J. B. J., PEARSON, J. P., McKNIGHT, S., KENDE, A. S., GREENBERG, E. P., IGLEWSKI, B. H. Quinolona signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 112229-11234, 1999.
- PILLAI, S.D., JERUDHASAN, P.R. Quorum sensing: how bacteria communicate. **Food Technology**, v.60, n.4, p.42-50, 2006.
- PINTO, C.L.O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT**. 97p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- PINTO, U.M., VIANA, E.D.S, MARTINS, M.L., VANETTI, M.C.D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food control**, v. 18, n.10, p.1322-1327, 2007.
- RASCH, M., ANDERSEN, J. B., NIELSEN, K. F., FLODGAARD, L. R., CHRISTENSEN, H., GIVSKOV, M., GRAM, L. Involvement of bacterial quorum sensing signals in spoilage of bean sprouts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3321-3330, 2005.
- REVERCHON, S., CHANTEGREL, B., DESCHAYERS, C., DOUTHEAU, A., COTTE-PATTAT, N. New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. **Bioorganic Medical Chemical Letters**, v. 12, p. 1153-11576, 2002.
- RIEDEL, K., KÖTHE, M., KRAMER, B., SAEB, W., GOTSCHILICH, A., AMMENDOLA, A., EBERL, L. Computer-aided design of agents that inhibit the *cep* Quorum-sensing system of *Burkholderia cenocepacia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V, 50, p.318-323, 2006.

- ROCHE, D.M., BYERS, J.T., SMITH, D.S., GLANSDORP, F.G., SPRING, D.R., WELCH, M. Communication blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? **Microbiology**, v.150, p. 2023-2028, 2004.
- SCHAEFER, A.L., HANZELKA, B.L., EBERHARD, A., GREENBERG, E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 2897-2901, 1996.
- SCHAUDER, S., BASSLER, B. L. The language of bacteria. **Genes & Development**, v. 15, p. 1468-1480, 2001.
- SCHAUDER, S., SHOKAT, K, SURET, M.G., BASSLER, B.L. The *luxS* family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule. **Molecular Microbiology**, v.41, p.463-476, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T.E., **Molecular Cloning**. A laboratory Manual. ColdSpring Harbor. New York, 1989.
- SAHAFFERMANT, A., HELISNSKI, D.R., Structural properties of β origin of replication of plasmid R6K. **Journal of Bacteriological chemistry**, v. 258, p.4083-4090, 1983.
- SMITH, K.M., BU, Y., SUGA, H. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa*: quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. **Chemical Biology**, v. 10, p. 81-89, 2003.
- SMITH, J. L., FRATAMICO, P. M., NOVAK, J.S., Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.
- SNYDER, L. & CHAMPNESS, W. **Molecular Genetics of Bacteria**. 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C., 566p., 2003.
- SPERANDIO, V., TORRES, A.G., JARVIS, B., NATARO, J.P., KAPER, J.B. Bacteria host-communication: the language of hormones. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 100, p. 8951-8956, 2003.
- STILES, M.E., NG, L. Biochemical Characteristics and Identification of Enterobacteriaceae Isolated from Meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, P.639-645, 1981.
- SUMMERFELT, S.T. Ozonation and UV irradiation – an introduction and examples of current applications. **Aquaculture Eng.**, v. 28, p. 21-36, 2003.
- SWIFT, S., DOWNIE, J.A., WHITEHEAD, N.A., BARNARD, A.M.L, SALMOND, G.P.C., WILLIAMS, P. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. **Advances in Microbial Physiology**, v. 45, p. 1999-270, 2001.

- ULRICH, R. L. Quorum quenching: enzymatic disruption of n-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6173-6180, 2004.
- WHITEHEAD, N. A., BARNARD, A. M. L., SLATER, H., SIMPSOM, N. J. L., SALMOND, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 25, p. 365-404, 2001.
- WU, F., LEVCHENKO, I., FILUTOWICS, M. A DNA segment conferring stable maintenance on R6K γ -origin core replicons. **Journal of bacteriology**, v. 177, p.6338-6345.
- VIANA,E.S. **Detecção de moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotólicas isoladas de leite**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- ZHANG, H.B., WANG, L.H., ZHANG, L.H. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 4638-4643, 2002.
- ZHU, J. BEABER, J.W., MORE, M.I., FUQUA, C., EBEHARD, A., WINANS, S.C. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5398-5405, 1998.