

ELISETH DE SOUZA VIANA

**MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM*  
*SENSING* EM BIOFILMES FORMADOS POR  
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE LEITE**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V614m Viana, Eliseth de Souza, 1976-  
2006 Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em biofilmes  
formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite /  
Eliseth de Souza Viana. – Viçosa : UFV, 2006.  
xv, 159f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Biofilmes. 2. Comunicação celular. 3. Bactérias  
psicrotróficas. 4. Leite - Bacteriologia. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.001579

ELISETH DE SOUZA VIANA

**MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM*  
*SENSING* EM BIOFILMES FORMADOS POR  
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE LEITE**

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

APROVADA: 12 de dezembro de 2006.

---

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani  
(Co-orientador)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola  
(Co-orientador)

---

Dr<sup>a</sup> Virgínia Maria Chaves Alves

---

Dr<sup>a</sup> Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

À minha querida filha Júlia, que deu sentido à minha vida e  
tornou-se a razão do meu viver;  
ao Seiji, pelo amor e companheirismo.  
MAIS UMA VEZ, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que, com seu imenso amor e compreensão, nunca me desamparou, mesmo nos momentos mais difíceis de minha jornada, dando-me forças para vencer.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos meus pais Álvaro e Juraci, por me concederem a vida.

A Iolanda, Conceição, Idalina e Danielle, por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos demais familiares, em especial à minha querida irmã Viana, por ser sempre tão amiga e prestativa, e por estar sempre ao meu lado nos momentos alegres e também naqueles de dificuldade. À minha irmã Cristiana, por ter cuidado de minha filha no seu primeiro ano de vida.

Ao Seiji, por me apoiar, incentivar e por torcer pelo meu sucesso.

A minha querida filha Júlia pela companhia, pelo carinho e pela demonstração de amor.

A minha orientadora, Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela atenção, confiança, pelo apoio e estímulo imprescindíveis para o êxito deste trabalho.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelas sugestões, pela atenção e disponibilidade em ajudar sempre que solicitado.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pelos conselhos e por disponibilizar o uso de seu laboratório sempre que necessário.

À Dr<sup>a</sup>. Virgínia Maria Chaves Alves, por integrar a equipe e pelas informações sobre a técnica de cromatografia em camada delgada.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EPAMIG, pela participação na banca de defesa e pelas sugestões.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, que participaram da construção do meu saber.

Ao Ph.D. Everett C. Pesci da Universidade da Carolina do Leste (EUA), pela doação de quatro estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ao Ph. D. Michael Givskov da Universidade Técnica da Dinamarca, pela doação das estirpes *Serratia liquefaciens* MG1 e MG44, *Escherichia coli* MC1000 e MT102.

À Dr<sup>a</sup>. Cláudia Vanetti, do Núcleo de Microscopia da UFV, pela atenção e pelos ensinamentos sobre o uso do microscópio eletrônico de varredura.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, pela disponibilidade em prestar serviços, especialmente às “meninas” da secretaria.

Aos funcionários Pablo e Sr. Paulo, pela simpatia e atenção constantes.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Anaeróbios: Adriana Leandro, Adriana Ponce, Aline, Ana Andréa, Ana Diolina, Andréa, Bete, Carol, Cláudia Lúcia, Eliane, Emilene, Esther, Fernanda, Flávia, Janaína, Marcelão, Marcelo, Marília, Maurílio, Michele, Rafael, Renata, Rodrigo, Selma, Simone Paes, Simone Quintão, Solimar, Uelinton e Wanessa, pela convivência agradável e pela amizade.

A Maurílio e a Eliane, pela amizade e pelas reuniões agradáveis com fins de estudo ou descontração.

A Maria Emilene, pela amizade sincera, pelo companheirismo e pela disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

A Esther, Adriana Ponce, Marília e Solimar, pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

A Marcelin, do Laboratório de Anaeróbios, pela amizade, pela companhia agradável nos horários de almoço e pela confecção das figuras esquemáticas de *quorum sensing*, utilizadas na revisão de literatura.

A Bete Fantuzzi, pelo apoio, pela amizade e pela ajuda na formatação do índice.

A todos os amigos que estiveram presentes nos momentos mais difíceis: Paula, Akihiko, Márcio, Cristiane, Arlei, Poliane, Cláudia e Miguel, incentivando-me e apoiando-me, além dos cuidados que dispensaram à minha filha Júlia sempre que necessário.

Às amigas de infância Ana Amélia e Cilene, irmãs inseparáveis, que me fazem acreditar na amizade sincera e verdadeira por quem tenho tanta estima.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ELISETH DE SOUZA VIANA, filha de Juraci Souza Viana e Álvaro Atanásio Viana, nasceu em Pedra do Anta - MG, em 15 de novembro de 1976.

Foi membro do Programa Especial de Treinamento (PET) da Capes desde agosto de 1997 até a data de conclusão da sua graduação em Economia Doméstica, pela Universidade Federal de Viçosa, em outubro de 2000.

Em outubro do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos, defendendo tese em 20 de dezembro de 2002.

Em março de 2003, iniciou o Doutorado em Microbiologia Agrícola, na mesma área, e defendeu a tese em 12 de dezembro de 2006.

No mesmo ano, foi aprovada no concurso público da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA para o cargo de pesquisadora de nível III.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACOES .....	X
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1 .....	3
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1.1. BIOFILMES .....	3
1.1.1. Regulação da formação dos biofilmes .....	11
1.2. <i>QUORUM SENSING</i> .....	16
1.2.1. Modelos de <i>quorum sensing</i> .....	20
1.2.1.1. Em bactérias Gram-negativas: acil-homoserinas lactonas (AI-1) .....	20
1.2.1.2. Em bactérias Gram-positivas: peptídeos curtos .....	22
1.2.1.3. Linguagem universal: furanosil borato diéster (AI-2) .....	24
1.2.2. Vantagens do sistema <i>quorum sensing</i> para as bactérias .....	27
1.2.3. Mecanismos de inibição do sistema <i>quorum sensing</i> .....	29
1.2.4. <i>Quorum sensing</i> em bactérias contaminantes de alimentos .....	34
1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
CAPÍTULO 2 .....	55
FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Pseudomonas fluorescens</i> E DETECÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE <i>QUORUM SENSING</i> .....	55
2.1. INTRODUÇÃO .....	55

2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	58
2.2.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo.....	58
2.2.2. Ensaio de formação do biofilme em diferentes meios de cultura .....	60
2.2.3. Atividade proteolítica das células sésseis e planctônicas.....	61
2.2.4. Detecção de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> .....	61
2.2.4.1. Homoserinas lactonas aciladas (autoindutor-1) .....	61
2.2.4.2. 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS).....	63
2.2.5. Efeito da adição de homoserinas lactonas aciladas sintéticas no crescimento e na formação de biofilme.....	64
2.2.6. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável .....	65
2.2.6.1. Quantificação das células sésseis.....	66
2.2.6.2. Observação dos biofilmes por microscopia de epifluorescência .....	66
2.2.6.3. Determinação da atividade proteolítica das células sésseis.....	67
2.2.7. Detecção de moléculas sinalizadoras nos biofilmes .....	67
2.2.8. Detecção de homoserinas lactonas aciladas nos extratos de células planctônicas e sésseis .....	68
2.2.9. Caracterização das homoserinas lactonas aciladas .....	69
2.2.10. Efeito da adição de ativadores e de inibidores de <i>quorum sensing</i> na formação de biofilme .....	70
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
2.3.1. Formação de biofilme em diferentes meios de cultivo .....	73
2.3.2. Atividade proteolítica das células livres e planctônicas de <i>P. fluorescens</i> ....	78
2.3.3. Detecção de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> produzidas por <i>P.</i> <i>fluorescens</i> .....	80
2.3.4. Efeito de homoserinas lactonas aciladas no crescimento e na formação de biofilme de <i>P. fluorescens</i> .....	82
2.3.5. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável por <i>P. fluorescens</i> ....	83
2.3.5. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável por <i>P. fluorescens</i> ....	83
2.3.6. Observações microscópicas de biofilmes .....	85
2.3.7. Detecção de moléculas sinalizadoras nos biofilmes formados por <i>P.</i> <i>fluorescens</i> .....	88
2.3.8. Detecção de homoserinas lactonas aciladas nos extratos de células sésseis e planctônicas .....	89
2.3.9. Caracterização das homoserinas lactonas aciladas .....	91
2.3.10. Efeito da adição de inibidores e de ativadores de <i>quorum sensing</i> no crescimento e na formação de biofilme.....	92
2.4. CONCLUSÕES .....	95
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

CAPÍTULO 3 .....	105
DETECÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE <i>QUORUM SENSING</i> EM BIOFILMES FORMADOS POR <i>Hafnia alvei</i> e <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	105
3.1. INTRODUÇÃO .....	105
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	108
3.2.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo .....	108
3.2.2. Crescimento e atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas .....	109
3.2.3. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável .....	109
3.2.4. Efeito da adição de ativadores e de inibidores de <i>quorum sensing</i> na formação de biofilme .....	110
3.2.5. Detecção de moléculas sinalizadoras nos biofilmes formados por <i>H. alvei</i> .....	110
3.2.6. Observação dos biofilmes em microscópio eletrônico de varredura .....	111
3.2.7. Detecção de homoserinas lactonas aciladas nos extratos de células sésseis e planctônicas de <i>H. alvei</i> .....	112
3.2.8. Caracterização das homoserinas lactonas aciladas .....	113
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	115
3.3.1. Crescimento e atividade proteolítica de isolados psicrotróficos e de <i>S.</i> <i>liquefaciens</i> .....	115
3.3.2. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável .....	117
3.3.3. Detecção de N-acil-homoserinas lactonas em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite .....	122
3.3.4. Determinação da produção de homoserinas lactonas aciladas por células sésseis e planctônicas de <i>H. alvei</i> .....	125
3.3.5. Efeito da adição de inibidores e de ativadores de <i>quorum sensing</i> no crescimento e na formação de biofilme .....	126
3.3.6. Observação de biofilmes de <i>H. alvei</i> por microscopia eletrônica de varredura .....	131
3.3.7. Caracterização das homoserinas lactonas aciladas .....	136
3.4. CONCLUSÕES .....	142
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	143
APÊNDICE .....	150

## LISTA DE ABREVIACOES

$\beta$ -gal –  $\beta$ -galactosidase

ABL –  $\alpha$ -amino- $\delta$ -butirolactona hidrobrometo

ACP – Proteína carreadora de acil

AHL – Homoserina lactona acilada

AI – autoindutor

CV026 – Estirpe mutante de *Chromobacterium violaceum* biosensora de AHL

C10-HSL – N-decanoil-DL-homoserina lactona

C12HSL – N-dodecanoil-DL-homoserina lactona

C14HSL – N-tetradecanoil-DL-homoserina lactona

CCD RP – Cromatografia em Camada Delgada de Fase Reversa

DHL – decanoil-DL-homoserina lactona

DDHL – N-dodecanoil-DL-homoserina lactona

DKP – Diketopiperazina

DMF – 2,2-dimetil-3(2H)-furanona

F – 2(5H)-furanona

HHL – N-hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL)

LB – Meio Luria Bertani

LDR 12% - Leite desnatado reconstituído a 12%

MF-3-metil – 2(5H) furanona

MMS – Meio mínimo de sais

MTHF – 2-metiltetrahydro furan-3-ona

3-oxo-C12-HSL – 3-oxo-dodecanoil-DL-homoserina lactona

OHHL – N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL)  
OOHL – N-3-oxooctanoil-L-homoserina lactona (3-hidroxi-C8-HSL)  
ONPG – o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo  
PAI1 – N-3-oxododecanoil-homoserina lactona (3-oxo-C12-AHL ou OdDHL)  
PAI2 – N-butanoil-L-homoserina lactona (C4-AHL ou BHL)  
PAIs – peptídeos autoindutores  
PQS – 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona  
QS – *quorum sensing*  
SAM – S-adenosil metionina  
SLC – sobrenadante livre de células  
TDHL – tetradecanoil-DL-homoserina lactona  
TYEP – Meio triptona, extrato de levedura e fosfato  
UFC mL<sup>-1</sup> – Unidades formadoras de colônias por mililitro  
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## RESUMO

VIANA, Eliseth de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Marcos Rogério Tótola.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo na formação de biofilmes e na atividade proteolítica de células sésseis e planctônicas de bactérias psicrotróficas isoladas de leite refrigerado; detectar a presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* produzidas por esses isolados e avaliar o efeito de furanonas e de acil homoserinas lactonas (AHLs) na formação de biofilmes. O crescimento de *Pseudomonas fluorescens* foi acompanhado em microplacas de poliestireno contendo diferentes meios de cultivo. A atividade proteolítica foi determinada, utilizando-se a azocaseína como substrato. As estirpes monitoras *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* A136, WCF47 e KYC55 e *Escherichia coli* pSB403 foram utilizadas para estudar a produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em células sésseis e planctônicas em ensaios de difusão em meios de cultura e em cromatografia em camada delgada (CCD). O efeito de furanonas e de AHLs na formação de biofilmes foi avaliado por espectrofotometria e por microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se que meios complexos favoreceram o crescimento, mas não a formação dos biofilmes por estirpes de *P. fluorescens*. O cultivo em meio mínimo de sais – MMS, contendo glicerol como fonte de carbono, aumentou a formação de

biofilmes de *P. fluorescens* em microplacas e em cupons de aço inoxidável e os isolados 097, 0109, 0137 e 0141 destacaram-se por apresentar maior número de células sésseis. Isolados de *Hafnia alvei* 067, 071 e *Aeromonas hydrophila* 099 também aderiram aos cupons de aço inoxidável imersos nos meios MMS, indicando o potencial destes isolados para formar biofilme. Em MMS, a atividade proteolítica da estirpe 097 de *P. fluorescens* aumentou com o aumento do número de células viáveis e foi favorecida em meio triptona, extrato de levedura e fosfato - TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub>. A indicação da produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em biofilmes de *P. fluorescens* 097 foi obtida pela redução da produção de violaceína pela estirpe *C. violaceum* e pelo estímulo da produção de β-gal por *A. tumefaciens* WCF47 na presença de células sésseis e de extratos dessas células. Entretanto, a presença de moléculas sinalizadoras em extratos de células sésseis e planctônicas de *P. fluorescens* não foi confirmada pela técnica de CCD. A produção de AHLs foi detectada nos biofilmes de *H. alvei* 059, 067, 071 e *A. hydrophila* 099, sendo *A. tumefaciens* WCF47 a estirpe monitora mais sensível. Os extratos obtidos a partir de células sésseis e planctônicas de *H. alvei* 071 induziram resposta positiva nas monitoras *E. coli* pSB403 e *A. tumefaciens* WCF47 nos ensaios de difusão em ágar e em cromatografia em camada delgada. Verificou-se diferença significativa na inibição da formação de biofilmes de *H. alvei* 071 pelas furanonas, e este resultado foi confirmado por imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. A adição de AHLs não afetou a formação de biofilmes nas estirpes avaliadas. A detecção de moléculas sinalizadoras produzidas pelas células sésseis das estirpes de *H. alvei* avaliadas e o efeito inibidor da adição de furanonas na formação dos biofilmes sugeriram a participação do sistema *quorum sensing* na regulação da formação dessas estruturas. Os resultados obtidos contribuem para melhor entendimento de mecanismos envolvidos na regulação da formação de biofilmes por bactérias isoladas de leite e servirão para a elaboração de estratégias de prevenção e controle de sua formação.

## ABSTRACT

VIANA, Eliseth de Souza, D.Sc., Federal University of Viçosa, December 2006.  
**Quorum sensing signaling molecules in biofilms formed by psychrotrophic bacteria isolated from milk.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-Advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Marcos Rogério Tótola.

This study aimed to evaluate the effect of different culture media on biofilm formation and proteolytic activity of sessile and planktonic cells of psychrotrophic bacteria isolated from cooled milk; to detect the presence of quorum sensing signaling molecules produced by these isolates and to evaluate the effects of furanones and acyl homoserines lactones (AHLs) on biofilm formation. The growth of *Pseudomonas fluorescens* was evaluated in polystyrene microplates containing different culture media. The proteolytic activity was determined using azocasein as substrate. The monitor strains *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* A136, WCF47 and KYC55 and *Escherichia coli* pSB403 were used to study the production of quorum sensing signaling molecules produced by sessile and planktonic cells in agar diffusion assays and in thin layer chromatography (TLC). The effects of furanones and AHLs in biofilm formation were evaluated by spectrophotometry and scanning electronic microscopy. It was verified that complex media favored growth, but not biofilm formation by *P. fluorescens* strains. The salts minimal media – MMS containing glycerol as carbon source enhanced biofilm formation by *P. fluorescens* in microplates and in stainless steel coupons and the strains 097, 0109, 0137 had higher numbers of sessile cells. *Hafnia alvei* 067, 071 and *Aeromonas hydrophila* 099 also adhered to coupons of stainless steel immersed

in MMS, indicating the potential for these isolates to form biofilms. In MMS, the proteolytic activity of *P. fluorescens* 097 increased with the increase in viable cell number. The proteolytic activity was favored in tryptone yeast extract and phosphate media – TYEP added with CaCl<sub>2</sub>. The evidence for quorum sensing signaling molecules production in *P. fluorescens* 097 was obtained by reduction of violacein production by *C. violaceum* and  $\beta$ -gal production by *A. tumefaciens* WCF47 in the presence of sessile cells and extracts from these cells. However, the presence of signaling molecules was not confirmed by TLC. The production of AHL was detected in biofilms of *H. alvei* 059, 067, 071 and *A. hydrophila* 099, being *A. tumefaciens* WCF47 the monitor strain most sensible to AHLs. The extracts obtained from planktonic cells supernatants of *H. alvei* 071 induced positive responses in the monitors *E. coli* pSB403 and *A. tumefaciens* WCF47 in agar diffusion assays and in TLC. A significant difference was verified in the inhibition of biofilm formation by *H. alvei* 071 in the presence of furanones and scanning electronic microscopy images confirmed this result. The addition of AHLs did not affect the biofilm formation in the strains evaluated. The detection of signaling molecules produced by sessile cells of *H. alvei* strains and the inhibitory effect of furanones suggest that quorum sensing influences the regulation of these structures. These results contributed to better understand the mechanisms involved in the regulation of biofilm formation by bacteria isolated from milk and it can also contribute to propose new strategies to prevent and control biofilm formation.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Em ambientes diversos, as bactérias podem ser encontradas na forma planctônica ou sésil. Na forma planctônica, vivem como organismos livres, individuais e flutuantes; na forma sésil as células bacterianas encontram-se aderidas a uma superfície ou interface, formando biofilmes constituídos por uma comunidade integrada.

Os biofilmes bacterianos têm recebido atenção considerável da comunidade científica nos últimos anos, em razão da sua ubiquidade em ambientes naturais, clínicos e industriais. Existe grande preocupação com a resistência apresentada pelas bactérias que os constituem a agentes antimicrobianos e ao sistema de defesa de hospedeiros infectados. Na indústria de alimentos, outro fator preocupante é a possibilidade de as células se transferirem do biofilme e de colonizarem linhas de processamento de alimentos e outras superfícies de contato, podendo afetar a qualidade e a segurança do produto final, colocando em risco a saúde dos consumidores.

Nos biofilmes, as populações bacterianas encontram-se aderidas a uma superfície ou umas às outras e imersas em uma matriz polimérica orgânica que confere proteção a seus membros. Os biofilmes podem ser formados por bactérias deterioradoras e patogênicas sob condições apropriadas, sendo que fatores como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e de nutrientes influenciam a sua formação.

Uma vez que os biofilmes são constituídos de agregados de células e a formação de sua estrutura tridimensional é um processo dinâmico que envolve uma

série de eventos moleculares coordenados, representam um ambiente propício para a comunicação célula-célula, ou *quorum sensing* (QS).

O QS é um sistema de comunicação entre bactérias dependente de densidade populacional. Nesse sistema, as bactérias produzem compostos sinalizadores de baixo peso molecular, os autoindutores bacterianos, que são liberados no ambiente. Quando uma quantidade crítica desses compostos é atingida, as bactérias detectam a presença de um número suficiente ou quórum de bactérias e respondem por meio da ativação ou repressão de certos genes.

A ocorrência de biofilmes em equipamentos, latões, tanques de resfriamento e tubulações na indústria de laticínios representa risco potencial de contaminação antes e após o processamento, que pode ocasionar deteriorações ou enfermidades de origem alimentar. Outros aspectos indesejáveis dos biofilmes na indústria de laticínios são a redução da transferência de calor em pasteurizadores, a diminuição do fluxo das tubulações, a ocorrência de processos corrosivos em equipamentos, além da resistência apresentada pelas bactérias aos sanificantes comumente empregados. As bactérias Gram-negativas são as mais frequentemente encontradas como contaminantes de leite cru granelizado e refrigerado e muitas são encontradas formando biofilmes. Além disso, muitas espécies desse grupo sintetizam proteases termorresistentes, além de outras enzimas hidrolíticas como lipases e lecitinases, que comprometem a qualidade do leite e de derivados.

Em razão dos problemas potenciais que bactérias Gram-negativas representam para a indústria de leite e derivados, faz-se necessário estudar os fatores que influenciam a formação dos biofilmes por esse grupo, a fim de estabelecer procedimentos que previnam o seu desenvolvimento. Este estudo buscou investigar a formação de biofilmes por bactérias psicrotóxicas proteolíticas isoladas de leite e sua relação com o sistema *quorum sensing*.

## **CAPÍTULO 1**

### **1 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **1.1. Biofilmes**

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades de microrganismos imobilizados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem bacteriana e representam a forma de vida microbiana predominante no planeta (XAVIER et al., 2005). Essas comunidades protegem os microrganismos em ambientes hostis e garantem o acesso a nutrientes para a sobrevivência (POUSEN, 1999; FUX et al., 2005). Agregados microbianos presentes em interfaces ar-líquido, líquido-líquido, ou agregados flutuantes como flocos ou grânulos, enquadram-se igualmente na definição de biofilmes. Apesar de essas estruturas serem geralmente associadas a finos filmes microbianos com espessuras da ordem de micrômetros ou milímetros, alguns biofilmes podem atingir vários centímetros, como no caso dos tapetes de algas (XAVIER et al., 2005).

As vantagens da permanência das células bacterianas em biofilmes são numerosas, principalmente no que se refere à proteção contra agentes agressivos. Além da resistência a sanitizantes e antibióticos, os biofilmes apresentam também resistência à radiação UV e à desidratação (ELASRI e MILLER, 1999). Sendo assim, percebe-se que a fisiologia das células do biofilme é, notoriamente, diferente, das células que vivem em modo planctônico.

Não há consenso a respeito do número de células que é necessário para formar os biofilmes. RONNER e WONG (1993) consideraram como biofilme um número de  $10^3$  células aderidas por  $\text{cm}^2$ , enquanto WIRTANEN et al. (1996) e ANDRADE et al. (1998) afirmaram ser necessária uma população de células de  $10^5$  e  $10^7$  células por  $\text{cm}^2$ , respectivamente.

Os biofilmes têm importância em várias atividades humanas. Estações de tratamento de água ou de efluentes removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica na água ou efluente, utilizando-se de biofilmes. Em sistemas aquáticos e no solo, os biofilmes multi-espécies podem ser encontrados na ciclagem de nutrientes como nitrogênio, enxofre e carbono. Numerosos bioprocessos também utilizam biofilmes. Alguns exemplos incluem a produção de vinagre (QURESHI et al., 2005), a produção de ácido cítrico (SAKURAI et al., 1997), aplicações farmacêuticas como a produção de metabólitos secundários (OKITA e KIRWAN, 1986) e processos biológicos para a extração de metais a partir de minério (RAWLINGS, 2002).

O crescimento não-desejado de biofilmes, por outro lado, tem impacto negativo em várias atividades. Danos em equipamentos resultantes da biocorrosão, contaminação de produtos, perdas energéticas, redução da transferência de calor e perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos do acúmulo de biofilmes microbianos (JASS e WALKER, 2000) e representam perdas significativas para as indústrias, dentre elas a de alimentos. Os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies, em razão de falhas nos procedimentos de higienização, são fontes potenciais de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular. Essa multiplicação dá origem às colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, o biofilme está formado (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). Reportam-se ainda a colonização microbiana em tubulações de águas, com conseqüente contaminação da mesma (WALKER et al., 1995) e acúmulo de biofilmes em superfícies de cascos de navios, o que ocasiona o aumento do consumo de combustível (COOKSEY e WIGGLESWORTHCOOKSEY, 1995; WALKER et al., 1995; SCHULTZ e SWAIN, 2000). Esses problemas são agravados pela maior resistência apresentada pelas células sésseis a métodos de limpeza e sanificação comumente empregados, comparativamente a células bacterianas de vida livre (SIMOES et al., 2003). Assim,

os métodos convencionais de higienização não são suficientes para a remoção dos biofilmes, sendo necessário o uso de doses elevadas de produtos químicos, indesejáveis do ponto de vista ambiental (JASS e WALKER, 2000).

O reconhecimento da ubiquidade dos biofilmes por microbiologistas da área clínica e de saúde pública auxiliou no entendimento de que doenças infecciosas, tais como fibrose cística, estão relacionadas à formação de biofilmes em tecidos vivos (COSTERTON et al., 1999). Algumas infecções causadas pela utilização de dispositivos médicos em ambientes clínicos, como cateteres, estão, de igual modo, relacionadas aos biofilmes (DONLAN, 2001). A matriz de polímeros extracelulares, que mantém o biofilme coeso, frequentemente denominada exopolissacarídeos (EPS), é possivelmente a responsável pela persistência das infecções relacionadas aos biofilmes (COSTERTON et al., 1978; CERI et al., 2001).

Algumas características de crescimento microbiano em biofilmes podem ser explicadas por meio de fenômenos de transferência (STEWART, 2003). Em culturas de células livres ou planctônicas, o transporte de solutos do meio líquido para a célula, ou vice-versa, é um processo relativamente rápido e não constitui um passo limitante dos bioprocessos celulares. Agregados microbianos, no entanto, são ambientes densamente povoados onde o fluxo de líquido é limitado. Embora ocorra fluxo de líquido nos poros dos biofilmes (De BEER et al., 1994; STOODLEY et al., 1994), nos agregados de células, a transferência de massa ocorre, principalmente, por meio da difusão (De BEER et al., 1994), um processo lento, que é agravado por limitações difusionais ocasionadas pela matriz do biofilme (BEULING et al., 2000; STEWART, 2003).

Nesses ambientes com limitação de transporte de solutos, os gradientes de concentração formados constituem condições favoráveis para a criação de micro-nichos. Baixas concentrações de oxigênio observadas no interior dos biofilmes (De BEER et al., 1993) podem originar micro-ambientes propícios à multiplicação de microrganismos anaeróbios, apesar da presença de oxigênio em solução no meio líquido. Limitações de transferência de massa, que impedem a penetração eficiente de antibióticos no biofilme, são também apontadas como possíveis causas para a resistência a esses agentes mencionada anteriormente (MAH e O'TOOLE, 2001).

A formação dos biofilmes inicia-se com a interação de células planctônicas com uma superfície em resposta a estímulos ambientais apropriados (O'TOOLE e KOLTER, 1998a; BRANDA et al., 2005; AN et al., 2006). Vários fatores

influenciam a adesão bacteriana às superfícies, como o tipo e as propriedades do material da superfície, carga e microtopografia, presença de matéria orgânica, temperatura e pH. Outros fatores são as características intrínsecas do microrganismo como espécie, carga, hidrofobicidade, presença de apêndices superficiais como pili, fimbrias, flagelos, cápsula, capacidade de sintetizar substâncias exopoliméricas e as características do meio que envolve o microrganismo (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BOWER et al., 1996; CHMIELESWSKI e FRANK, 2003).

A adesão às superfícies pode ser ativa ou passiva, dependendo da motilidade das células. A adesão passiva depende da gravidade, da difusão e da dinâmica do fluido. Na adesão ativa, a superfície celular facilita a adesão inicial (CHMIELESWSKI e FRANK, 2003), com participação dos flagelos, que permitem que as bactérias se movam para um sítio de adesão específico. Mudanças na fisiologia celular que afetam a superfície da membrana, como a síntese de proteínas adesinas, pili, polissacarídeos e a formação de agregados, também influenciam a adesão (BOWER et al., 1996). Durante a adesão reversível, as bactérias ainda exibem movimento Browniano e são facilmente removidas por aplicação de forças moderadas. A adesão irreversível é resultante do ancoramento dos apêndices e, ou da produção de polímeros extracelulares (KUMAR e ANAND, 1998; CHMIELESWSKI e FRANK, 2003).

As superfícies são de importância considerável para a formação dos biofilmes, pois os nutrientes podem nelas se adsorver fazendo com que a concentração de nutrientes disponível seja muito maior do que no meio fluido. Essa disponibilidade de nutrientes pode afetar a taxa de metabolismo microbiano (MADIGAN et al., 2000). A formação dos biofilmes em sistemas de distribuição de água sugere que condições limitantes de nutrientes estimulem a formação dessas estruturas (BROWN et al., 1977; POLSEN, 1999). Uma explicação provável para esse fato é que, em ambientes nutricionalmente pobres, os nutrientes disponíveis estão mais concentrados em superfícies sólidas do que no meio fluido. As bactérias sentem esse gradiente de concentração e migram para a superfície. Em ambientes com concentração elevada de nutrientes, os receptores de superfície celular tornam-se saturados e indisponíveis para a ligação específica às superfícies. Algumas superfícies, por si mesmas, podem ser consideradas como nutrientes, a exemplo da matéria orgânica, onde os microrganismos aderidos catabolizam nutrientes orgânicos e inorgânicos (MADIGAN et al., 2000).

Os biofilmes podem se desenvolver em quase todas as superfícies em ambientes onde existem células viáveis. A formação dos biofilmes é resultado de vários processos de natureza física e biológica, e caracteriza-se por uma seqüência de eventos complexos (XAVIER et al., 2005; AREVALO-FERRO, 2006). A teoria da formação dos biofilmes em cinco estágios estabelece a ocorrência das seguintes seqüências de eventos:

1. Adsorção de nutrientes à superfície e formação de um filme condicionante, contendo uma concentração elevada de nutrientes, quando comparada com a fase fluida e que favorece a formação do biofilme. A camada de nutrientes afeta as propriedades físico-químicas da superfície como a energia livre, a hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam e dão condições à colonização microbiana.
2. A iniciação dos biofilmes requer a adesão das células bacterianas a uma superfície ou interface e, em seguida, a formação de microcolônias. Esse processo é dependente da chance da bactéria entrar em contato com o local da aderência e de ocorrerem interações favoráveis para superar as forças repulsivas geradas pelas duas superfícies.
3. Crescimento e divisão de células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de exopolissacarídeos (EPS).
4. Fixação de células bacterianas flutuantes e de outras partículas, o que contribui para o acúmulo do biofilme.
5. Liberação de material celular por meio de erosão, perda de células individuais ou de agregados maiores.

Mecanismos de regulação da formação dos biofilmes podem estar presentes durante a adesão à superfície, a formação das microcolônias e durante o desenvolvimento da espessura e da arquitetura (STANLEY e LAZAZZERA, 2004). As etapas iniciais de adesão e formação de microcolônias são reguladas por sinais que diferem entre espécies bacterianas e refletem os seus ambientes naturais. Os passos da maturação, controle da profundidade e arquitetura são regulados por sinais conservados entre as espécies bacterianas e refletem a fisiologia das células no biofilme (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

A etapa inicial de formação do biofilme é muito complexa e é possível que uma variedade de estruturas de superfície bacteriana esteja envolvida na adesão,

podendo diferir entre as espécies bacterianas. Além disso, essas estruturas variam em função das propriedades particulares da superfície e do meio circundante (O'TOOLE et al., 2000a). Em *Pseudomonas fluorescens*, vários fatores interferem na capacidade de formar biofilme. Por exemplo, o tratamento das células com concentração baixa de protease resultou na perda da aderência, o que sugere a necessidade de proteínas extracelulares para a formação dos biofilmes (O'TOOLE e KOLTER, 1998b). Assim, a formação do biofilme depende das condições ambientais que irão induzir a expressão diferenciada de proteínas celulares (BRANDA et al., 2005). Em *Escherichia coli*, a expressão do pilus de conjugação acelera a adesão inicial e o desenvolvimento do biofilme (CHIGO, 2001), sendo que flagelos, pili tipo I e Ag43 também são requeridos (REISNER, 2003). A Ag43 é uma adesina que se auto-reconhece, pois o alvo de reconhecimento e o receptor localizam-se no mesmo polipeptídeo, sendo uma facilitadora da formação do biofilme por promover contato célula-célula por meio da interação Ag43-Ag43 (KJARGAARD et al., 2000).

Após a fixação inicial das células microbianas, as etapas seguintes definem a estrutura e a atividade do biofilme. Esses processos dependem de todos os fatores físicos que afetam o desenvolvimento de biofilmes e alguns fatores biológicos como crescimento, divisão celular, produção e excreção de exopolissacarídeos (EPS) (XAVIER et al., 2005). Além desses fatores, existem outros mais complexos, cuja relevância no desenvolvimento de biofilmes particulares foi constatada, a exemplo da regulação pelo sistema *quorum sensing* (DAVIES et al., 1998), a ocorrência de conjugação em maior frequência (EHLERS e BOUWER, 1999; HAUSNER e WUERTZ, 1999; ROBERTS et al., 1999) e da atividade do pilus polar tipo IV, requerido para ocorrência de um movimento associado à superfície. Esse movimento parece ser consequência da extensão e retração desse pilus. Enquanto a motilidade mediada por flagelo é responsável pela formação de monocamadas de células, o pilus tipo IV atua na formação das microcolônias (O'TOOLE e KOLTER, 1998a).

A matriz de EPS representa uma barreira seletiva entre as células e o meio externo. Essa matriz, dependendo da sua composição, constitui um ambiente capaz de captar nutrientes, aumentar a retenção de água, alterar substratos enzimaticamente e regular o transporte de água e nutrientes para dentro e para fora do biofilme. A composição do EPS varia em função da espécie, da estirpe e das condições de crescimento, incluindo a composição do meio, o teor de oxigênio, de carbono, a osmolaridade, o pH e a idade do biofilme. Em ambientes onde há baixa

disponibilidade de carbono, oxigênio e estresse hídrico, a produção de EPS é estimulada (STEINBERGER e HOLDEN, 2004).

A fase de desenvolvimento do biofilme ou maturação resulta na geração de uma arquitetura complexa com canais e poros (STOODLEY et al., 2002), que engloba a sua estrutura tridimensional, juntamente com a distribuição espacial das substâncias bióticas e abióticas nele imobilizadas. Essa estrutura define a forma da interface biofilme/líquido por meio da qual ocorre todo o transporte de massa de solutos (XAVIER et al., 2005). A distribuição espacial de substâncias imobilizadas diz respeito à distribuição espacial de EPS, de células bacterianas, possivelmente de diferentes espécies e de partículas inorgânicas. A estrutura pode ser descrita por meio de propriedades morfológicas, como espessura, densidade e forma da superfície do biofilme (XAVIER et al., 2005).

A estrutura de biofilmes tem função muito importante na atividade dos mesmos. Em conjunto com as condições hidrodinâmicas e o fornecimento de nutrientes, a forma do biofilme influencia a transferência de massa das espécies químicas envolvidas. A estrutura, por sua vez, é definida em parte pela atividade do biofilme: crescimento e divisão das células microbianas, produção e excreção de EPS, em conjunto com fatores externos como as forças de atrito definidas pela hidrodinâmica e outras forças mecânicas envolvidas; por exemplo, processos mecânicos de limpeza e predação por protozoários. Entender a relação entre estrutura e atividade de biofilmes e os fatores que fisicamente modelam a sua forma é crucial para utilizar ou controlar biofilmes em ambientes industriais ou clínicos (STOODLEY et al., 1999).

SAUER et al. (2002) demonstraram que células de *P. aeruginosa* em biofilmes maduros apresentaram perfis de expressão gênica diferentes, sendo que mais de 50 % do total de proteínas detectadas foram expressas em concentrações superiores a seis vezes, quando comparado com células planctônicas cultivadas em quimiostatos. Dentre as mais de 800 proteínas detectadas, 300 foram expressas em biofilmes maduros, mas não nas células planctônicas. As proteínas identificadas pertenciam às cinco principais classes: proteínas do catabolismo de carbono e metabolismo de aminoácidos, proteínas envolvidas na biossíntese de fosfolípidos e lipopolissacarídeos, na secreção e transporte de membrana e em mecanismos de adaptação e proteção.

Dispersão ou desagregação são termos utilizados para descrever a liberação das células, individualmente ou em grupos, do biofilme ou do substrato onde se encontram fixadas. A desagregação ativa é um fenômeno fisiologicamente regulado, mas poucos estudos foram realizados para demonstrar a base biológica desse processo (STOODLEY et al., 2001). BOYD e CHAKRABARTY (1995) reportaram que a enzima alginato liase pode desempenhar uma função na fase de desagregação do biofilme de *P. aeruginosa*. A desagregação do biofilmes de *P. fluorescens* incubados por longo período foi atribuída à redução de EPS (ALLISON et al., 1998). O estado de escassez nutricional pode levar à desagregação por um mecanismo desconhecido, que permite que as bactérias busquem habitats ricos em nutrientes (O'TOOLE et al., 2000b).

O interesse de estudiosos de diferentes áreas levou à investigação de vários sistemas de biofilmes, utilizando técnicas diversificadas, que vão desde métodos de microbiologia molecular aplicados a biofilmes mono-espécie, cultivados em laboratório, até à utilização de micro-sensores para o estudo de tapetes de algas (LARKUM et al., 2003), passando pela utilização de reatores em escala industrial (TIJHUIS et al., 1996). Essa abordagem multidisciplinar originou a descrição de tipos de estruturas e a formulação de modelos conceituais dos biofilmes (STOODLEY et al., 1999). No entanto, um modelo conceitual formulado a partir da investigação de um sistema particular não deve ser generalizado para a totalidade dos sistemas de biofilmes, como aconteceu no passado com o modelo designado modelo dos canais hídricos (COSTERTON et al., 1994). Essa generalização parece ser incorreta, especialmente em razão da evidência de que cada comunidade microbiana é única (TOLKER-NIELSEN e MOLIN, 2000). Além disso, variações de estrutura podem ser observadas para o mesmo sistema, quando as condições de cultivo foram alteradas (Van LOOSDRECHT et al., 1995). A visão consensual de que a estrutura de biofilmes pode demonstrar elevada heterogeneidade espacial e temporal parece ser a mais exata (STOODLEY et al., 1999).

Em decorrência do envolvimento dos biofilmes em um amplo espectro de atividades humanas, investigadores de várias áreas vêm estudando essas estruturas para impedir as infecções a eles relacionadas ou seu acúmulo indesejado em equipamentos industriais e também para utilizá-los em aplicações bioindustriais particulares.

### 1.1.1. Regulação da formação dos biofilmes

A adaptação genética é a base da sobrevivência e resulta de mutações, recombinação de genes, aquisição de material genético exógeno ou na regulação da expressão do material genético existente. As bactérias conseguem sobreviver em ambientes onde as condições mudam constantemente, em decorrência da flexibilidade de expressão de seus genes. Muitas bactérias patogênicas e comensais são capazes de transitar entre a vida no meio ambiente e no hospedeiro humano, sendo capazes de se adaptarem a alterações súbitas na disponibilidade de nutrientes e nas respostas do sistema imune do hospedeiro (JEFFERSON, 2004).

O biofilme é um exemplo clinicamente relevante de adaptação, onde as bactérias que o integram crescem como parte da comunidade sésil em uma matriz de exopolissacarídeos. Estudos de proteínas e genes específicos levaram à identificação de um número expressivo de genes associados com o desenvolvimento do biofilme e mostraram que sua formação é cíclica e dinâmica. As condições ambientais induzem alterações na expressão de um subconjunto de genes requeridos para a formação do biofilme e o seu desenvolvimento altera o microambiente de seus próprios habitantes (JEFFERSON, 2004).

O estresse nutricional é o principal responsável pela agregação e formação dos biofilmes, que é a resposta adaptativa para sobrevivência em ambientes desfavoráveis (WEBB et al., 2003). Outro mecanismo que favorece a adesão é a divisão binária das células aderidas. Quando as bactérias se dividem, as células filhas se disseminam em todas as direções a partir do ponto da adesão para formar aglomerados de células semelhantes às colônias observadas nas placas de ágar (HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2002).

Cátions divalentes como o  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  podem influenciar diretamente a formação do biofilme por meio de seu efeito nas interações eletrostáticas e indiretamente, agindo como co-fatores de enzimas (FLETCHER, 1998). As interações eletrostáticas contribuem para a coesão dos biofilmes, sendo os cátions os responsáveis por fazerem ligações na matriz dos biofilmes e por contribuírem com a integridade e estabilidade da membrana externa das bactérias Gram-negativas (SONG e LEFF, 2006).

Embora o contato inicial da célula com a superfície não seja necessariamente regulado, existe evidência de que a formação de interações estáveis

da célula com a superfície seja regulada (STANLEY e LAZAZZERA, 2004). Estudos com o sistema de sinalização Cpx de *E. coli* indicam que as bactérias sentem o contato com a superfície e, em resposta, alteram a expressão gênica para promoverem interações estáveis. O sistema de sinalização Cpx é uma via típica de sinalização de dois componentes que inclui uma proteína sensora cinase e fosfatase (CpxA) e uma reguladora de resposta (CpxR) (RAIVIO e SILHAVY, 1997). O mutante *cpxR* forma interações menos estáveis em comparação com a estirpe selvagem. A transdução dos sinais através dessa via é dependente de uma proteína da membrana externa, NlpE, que pode ser o sensor direto de contato com a superfície (OTTO e SILHAVI, 2002).

A formação de biofilmes com menor quantidade de biomassa pelas estirpes mutantes *cpxA* de *E. coli* confirma a necessidade de interações estáveis entre células e superfície (DOREL et al., 1999). Os genes regulados por Cpx que são requeridos para promover as interações célula-superfície ainda estão indefinidos. Entretanto, sabe-se que a via de sinalização Cpx possivelmente regula a formação de P-pili que pode desempenhar a função de adesão à superfície (HUNG et al., 2001). Muitos apêndices extracelulares estão envolvidos na adesão às superfícies por outras espécies bacterianas (O'TOOLE et al., 2000b).

O pilus tipo IV de *P. aeruginosa* tem efeitos múltiplos na formação de biofilmes (O'TOOLE e KOLTER, 1998a; HEYDORN et al., 2002). O pilus tipo IV media a motilidade do tipo contrátil (*twitching*), que permite movimento sobre uma superfície. Ainda não se sabe se essa motilidade é regulada; entretanto, sabe-se que a produção do pilus o é. O regulador do metabolismo global do carbono, Crc, ativa a transcrição de *pilA*, que é requerido para a produção do pilus tipo IV (O'TOOLE et al., 2000a). Esses autores avaliaram o evento inicial de formação de biofilme por meio do mutante *crc* de *P. aeruginosa* e atribuíram a formação atenuada do biofilme ao defeito na expressão do pilus tipo IV. A função de Crc no desenvolvimento do biofilme é sentir as condições nutricionais do meio por meio da expressão do pilus tipo IV. A contribuição relativa de cada mecanismo para a formação do biofilme depende do microrganismo, das propriedades da superfície a ser colonizada e das condições físico-químicas do meio.

Além das interações célula-superfície estáveis ocorrerem pelo contato com a superfície, essas interações podem também ser reguladas por condições ambientais, especialmente pelo aumento da osmolaridade. O sistema de sinalização EnvZ/OmpR,

outra via de sinalização de dois componentes em *E. coli*, parece ter a função de promover interações estáveis célula-superfície em resposta ao aumento da osmolaridade. Estirpes de *E. coli* que expressam os alelos hiperativos de OmpR aderem-se melhor às superfícies (PRIGENT-COMBARET et al., 2001). O sistema de sinalização EnvZ/OmpR é ativado para gerar OmpR fosforilada sob condições de osmolaridade aumentada (MADIGAN et al., 2000), o que sugere que essa condição poderia estimular interações estáveis entre a célula e a superfície. OmpR fosforilada pode contribuir para a formação do biofilme ao ligar e ativar o promotor de *csgD*, sendo um regulador positivo de transcrição de *csgAB* e de *adrA* (ROMLING et al., 1998; CHIRWA e HERRINGTON, 2003). O operon *csgAB* codifica as subunidades estruturais requeridas para a biossíntese de *curli*, forma especializada de pilus responsável por aumentar a formação do biofilme (VIDAL et al., 1998; PRINGENT-COMBARET et al., 2001). O gene *adrA* codifica o regulador requerido para a produção de celulose, um componente da matriz polimérica dos biofilmes formados por *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium, sob algumas condições de crescimento (CHIRWA e HERRINGTON, 2003).

O sistema de sinalização EnvZ/OmpR é conservado em várias espécies bacterianas (MADIGAN et al., 2000) e pode representar o mecanismo pelo qual *E. coli* responde às superfícies sob condições limitadas de nutrientes. O acúmulo de proteínas, polissacarídeos e outras moléculas nas superfícies levam à formação de uma região metabolicamente favorável para as células microbianas. Esse nicho rico também representa uma região de maior osmolaridade quando o meio circundante tem concentração baixa de nutrientes. O sistema EnvZ/OmpR pode representar o mecanismo responsável por promover a adesão e a formação do biofilme.

A formação de biofilme por *E. coli* e por outras espécies é inibida sob condições de osmolaridade elevada (O'TOOLE e KOLTER, 1998b; PRIGENT-COMBARET et al., 2001).

O pH e a temperatura da superfície de contato também influenciam a adesão dos microrganismos (KUMAR e ANAND, 1998). A adesão de *Pseudomonas fragi* foi máxima em superfícies de aço inoxidável em pH na faixa de 7 a 8, faixa essa considerada ótima para seu metabolismo celular (STANLEY, 1983). No caso da bactéria marinha *Deleya mariana*, a adesão máxima foi observada a 25 °C, ou seja, na sua temperatura ótima de crescimento (SHEA et al., 1991). Também em *P. fluorescens* 041, o número de células aderidas a cupons de aço inoxidável, imersos

em leite desnatado reconstituído a 1 %, foi maior a 22 °C, próximo da temperatura ótima de crescimento, com valores cerca de 0,5 a 1 ciclo logaritmo maior do que a 7 °C (MACHADO, 2006). Entretanto, essa autora observou que em meio rico TYEP, o número de células aderidas não variou com a temperatura.

A expressão gênica pode ser significativamente alterada quando as células bacterianas formam o biofilme, e resulta em fenótipos diferenciados após a adesão à superfície (MARSH, 2005). Por exemplo, em *P. aeruginosa*, os genes responsáveis pela síntese de alginato são ativados 15 min após o contato da célula com a superfície (DAVIES e GEESEY, 1995).

Uma vez estabelecido o biofilme, a expressão de adesinas e fatores de motilidade é suprimida, o que sugere que a função principal das adesinas, pili e flagelos é participar da etapa inicial do estabelecimento do biofilme e, após esse estágio, essas proteínas ou estruturas protéicas não são mais necessárias e sua expressão é inibida (JEFFERSON, 2004).

O'Toole e Kolter (1998a) compararam mutantes de *P. aeruginosa* PA14 defectivos na iniciação de biofilmes em policloreto de vinila (PVC). Esses mutantes foram designados *sad* (surface attachment defective) e incluíram duas classes: (1) mutantes defectivos na motilidade mediada por flagelo; e (2) mutantes defectivos na biossíntese de pilus tipo IV. Os mutantes para a síntese do pilus tipo IV formaram monocamadas de células no PVC, mas não desenvolveram microcolônias, o que sugere que essas estruturas têm participação importante na formação das mesmas. Poucas células da estirpe imóvel, que apresentam mutação no gene responsável pela síntese do flagelo, *flgK*, aderiram-se ao PVC após oito h de incubação, sugerindo a atuação do flagelo e ou da motilidade nas interações iniciais da célula com a superfície.

As microcolônias são comunidades constituídas por três a cinco camadas de células bacterianas que se desenvolvem após a adesão à superfície (DAVEY e O'TOOLE, 2000). Para haver formação de microcolônias, é necessário ocorrer crescimento de clones controlado pela presença de nutrientes apropriados e interações célula-célula estáveis (REISNER et al., 2003). Algumas bactérias podem também exibir motilidade por contração durante a formação das microcolônias (O'TOOLE e KOLTER, 1998a). Entretanto, sistemas de transdução de sinais distintos são requeridos para a produção de estruturas superficiais de motilidade,

como pili, e para a produção de exopolissacarídeos responsáveis por mediar interações célula-célula estáveis (HEILMAN et al., 1996).

Após as etapas de adesão à superfície e formação das microcolônias, ocorre a maturação do biofilme. Os biofilmes podem ser espessos, homogêneos ou podem ser constituídos de estruturas complexas em forma de pilares com canais que permitem o influxo de água e de nutrientes e o efluxo de metabólitos (DAVEY e O'TOOLE, 2000). As estruturas dos biofilmes em algumas espécies variam em função de processos não-regulados pelas bactérias, como as forças físicas do fluxo. Entretanto, em outras espécies, essas estruturas podem variar em função de processos regulados pela disponibilidade de nutrientes ou por outros mecanismos como o *quorum sensing* (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

Em *Bacillus subtilis*, a espessura do biofilme maduro é reduzida pela repressão catabólica por meio do fator de transcrição CcpA (STANLEY et al., 2003). A atividade do grupo de proteínas CcpA's é dependente do estado de fosforilação do sistema de fosfotransferase, que reflete a atividade glicolítica da célula (HENKIN et al., 1996). CcpA é ativada para reduzir a espessura do biofilme na presença de uma fonte de carbono prontamente metabolizável, como a glicose. CcpA reprime a espessura do biofilme maduro por meio de um mecanismo desconhecido, possivelmente pela inibição da adesão das células do biofilme ou pelo aumento da dispersão das células do biofilme (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

A repressão catabólica pode ser um sinal regulatório disseminado que controla a formação do biofilme e, em *E. coli*, essa repressão ocorre por meio da proteína receptora de cAMP (CRP) (JACKSON et al., 2002). O passo preciso da formação do biofilme por *E. coli* que é afetado pela presença de glicose é desconhecido, mas, sabe-se que esse açúcar não influencia biofilmes pré-estabelecidos, o que sugere que a glicose inibe a adesão das células (JACKSON et al., 2002). A formação do biofilme é inibida pela repressão catabólica, possivelmente como indicador, para as células, de que estão em ambiente rico em nutrientes onde não existe vantagem em estarem na forma sésil, pois, no estado planctônico, existe maior área superficial das bactérias expostas a nutrientes (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

Em *P. aeruginosa*, a espessura do biofilme maduro é reduzida pela transcrição do fator RpoS (WHITELEY et al., 2001; HEYDORN et al., 2002), que direciona a entrada na fase estacionária em muitas espécies de bactérias Gram-

negativas (VENTURI, 2003). Mutantes incapazes de expressar RpoS formam biofilmes mais espessos em condições de fluxo de nutrientes (WHITELEY et al., 2001). A produção de RpoS é regulada em níveis, incluindo a transcrição e a tradução em resposta a diferentes condições de estresse, como a limitação de nutrientes (VENTURI et al., 2003). Assim, a ativação de RpoS de *P. aeruginosa* poderia ser um sinal de que os nutrientes encontram-se em condições limitantes em biofilmes.

O sistema RpoS afeta também a formação de biofilme por *E. coli* (ADAMS e MCLEAN, 1999). Entretanto, em contraste com *P. aeruginosa*, RpoS em *E. coli* é requerido para a iniciação do biofilme (ADAMS e MCLEAN, 1999). RpoS em *E. coli* pode ser ativado por condições de limitação moderada de nutrientes e resulta na iniciação da formação do biofilme, permitindo o acesso aos nutrientes presentes em uma superfície. À medida que os biofilmes tornam-se mais espessos, as células do centro dos mesmos podem ter acesso reduzido a nutrientes, o que resulta em forte sinal de desnutrição. Esse sinal em *P. aeruginosa* ativa RpoS para reduzir a espessura do biofilme. Sob condições severas de desnutrição, deve ser vantajoso para as células deixarem o biofilme e tornarem-se planctônicas (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

## **1.2. Quorum Sensing**

Os conceitos relacionados às bactérias estão sendo modificados consideravelmente nas últimas décadas. Anteriormente, as bactérias eram estudadas como populações de células que agiam de modo independente. Atualmente, sabe-se que existem diversas interações e comunicação entre as células. As bactérias 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 (FUQUA e PARSEK, 2001; KELLER e SURETTE, 2006).

A comunicação celular desempenha uma função central na fisiologia e no desenvolvimento de organismos vivos. Mesmo organismos unicelulares, como as bactérias, freqüentemente coordenam suas atividades de forma semelhante a entidades multicelulares (SHAPIRO, 1998). Essa coordenação necessariamente

requer a comunicação célula-célula, o que ocorre por meio da produção e liberação de compostos celulares específicos por células individuais. O acúmulo extracelular desses sinais denota a presença de população relativamente densa e faz com que as células apresentem um comportamento coordenado. Esse tipo de comunicação é conhecido como *quorum sensing* (QS) (FUQUA et al., 1994; GRAY e GAREY, 2001; READING e SPERANDIO, 2006).

O QS bacteriano é um fenômeno comum que favorece o acesso a nutrientes ou a nichos ambientais mais favoráveis, permite que as bactérias organizem respostas defensivas contra hospedeiros eucarióticos, além de otimizar a capacidade das bactérias de se diferenciarem em formas mais bem adaptadas a sobreviverem em ambientes hostis, onde as condições de crescimento são restritivas (SWIFT et al., 2001).

Muitos estudos demonstraram que o QS regula uma série de características fenotípicas, 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 (SMITH et al., 2004).

Ainda não está completamente elucidado como a comunicação celular ocorre nas bactérias. Pesquisas sobre a sinalização baseada em N-acil-homoserinas lactonas mostram que esse sistema é muito comum. Entretanto, os tipos de moléculas potenciais que as bactérias produzem e às quais respondem para se adaptarem em seu ambiente, incluindo ambientes competitivos, ainda são pouco exploradas e o número de moléculas sinalizadoras identificadas é crescente (KELLER e SURETTE, 2006).

As moléculas sinalizadoras 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). Outros sistemas de sinalização podem também ocorrer,

como em *Vibrio cholerae* que possui, no mínimo, três sistemas de QS que funcionam paralelamente e regulam a expressão de genes de virulência (MILLER et al., 2002). 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).

Dentre as moléculas sinalizadoras, três classes estão bem definidas e servem como paradigmas para a sinalização em bactérias: AHLs, oligopeptídeos e a classe LuxS/autoindutor-2 (KELLER e SURETTE, 2006).

O uso de bactérias biosensoras sugere que as AHLs são produzidas por bactérias em biofilmes de laboratório e em biofilmes oriundos de ambientes naturais (STICKLER et al., 1998; ANDERSEN et al., 2001), mas poucos estudos mostram a relação entre QS e a etapa inicial de formação do biofilme (PARSEK e GREENBERG, 2005). Huber et al. (2001) verificaram que o QS não está envolvido na adesão inicial do biofilme formado por *Burkholderia cepacia* H111, mas afeta as etapas subseqüentes. Por outro lado, SPERANDIO et al. (2002) demonstraram que o autoindutor-2 (furanosil borato diéster) é um sinal regulatório global em *E. coli* O157:H7 que regula mais de 400 genes, incluindo os da quimiotaxia, síntese de flagelo e motilidade, mostrando a possível relação do *quorum sensing* com a etapa inicial de formação do biofilme.

Batchelor et al. (1997) demonstraram a contribuição das AHLs na biologia do biofilme formado por *Nitrosomonas europaea*. A interferência do sistema QS na formação de biofilme foi também reportada em *Aeromonas hydrophila* (LYNCH et al., 2002), *Salmonella* Typhi (PROUTY et al., 2002) e em *Streptococcus mutans* (MERRIT et al., 2003).

Algumas pesquisas já demonstraram a regulação da maturação e da dissolução de biofilmes pelo sistema QS (PARSEK et al., 2005). Mutações no gene da sintase de AHL *lasI* de *P. aeruginosa*, responsável pela síntese de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, mas não em *rhlI* (que dirige a síntese de n-butanoil homoserina lactona [C<sub>4</sub>-HSL]), apresentaram efeito significativo no desenvolvimento do biofilme (DAVIES et al., 1998). As bactérias mutantes *lasI* foram incapazes de formar um biofilme espesso e estruturado, característico do formado pela estirpe parental selvagem (DAVIES et al., 1998). Estudos com *P. aeruginosa* mostram evidências mais diretas da função das AHLs no desenvolvimento dos biofilmes. *N*-(3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL)

acumulou-se nos biofilmes de *P. aeruginosa* em concentrações 4,5 vezes maiores do que as encontradas na fase planctônica (CHARLTSTON et al., 2000).

Outro mecanismo regulado por QS e identificado em células sésseis é a produção de surfactante. Os surfactantes são necessários para definir a estrutura arquitetônica de biofilmes formados por *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. O surfactante lipopeptídeo produzido pelos isolados selvagens de *B. subtilis* está relacionado com a esporulação (BRANDA et al., 2001). Em *P. aeruginosa*, a produção do surfactante ramnolipídeo é requerida para a manutenção das estruturas de pilares contendo canais para circulação de água e nutrientes (DAVEY et al., 2003).

O gene requerido para a produção de surfactante em *P. aeruginosa* é regulado pelo sistema QS *lasI-lasR* por meio do sistema QS *rhlI-rhlR* (PEARSON et al., 1997). O sistema *las* é composto pelo ativador transcricional LasR e pela sintase do autoindutor de N-3-oxo-C12-HSL, LasI. O sistema *rhl* é formado pelo ativador transcricional RhlR e pela sintase do autoindutor N-C4-HSL, Rhl. O sistema *rhl* está sob o controle transcricional e pós-transcricional do sistema *las* (PARSEK e GREENBERG, 2000). As estirpes mutantes *lasI* e *rhlI* de *P. aeruginosa*, sob certas condições ambientais, formam biofilmes sem a ocorrência de estruturas diferenciadas, como os formados pelas estirpes selvagens (DAVIES et al., 1998; De KIEVIT et al., 2001). Esse resultado é decorrente das baixas concentrações de ramnolipídeo formado pelas estirpes mutantes, entre outros fatores (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

A regulação dependente da densidade celular também pode ocasionar a liberação de enzimas que degradam a matriz de EPS, permitindo às bactérias se desagregarem do biofilme, quando a população atinge um número elevado nas microcolônias (STOODLEY et al., 2002). Allison et al. (1998) reportaram que a adição de N-hexanoil-homoserina lactona em biofilmes de *P. fluorescens* causou a redução do mesmo e a perda de EPS. A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* produz uma manosidase extracelular, que é regulada pelo QS, responsável por clivar xantana e contribuir para a dissolução dos agregados de células do biofilme (CROSSMAN e DOW, 2004). A desagregação dos biofilmes permitiria às bactérias colonizarem novas superfícies e reiniciarem novos ciclos de colonização (PARSEK e FUQUA, 2004).

### 1.2.1. Modelos de *quorum sensing*

#### 1.2.1.1. Em bactérias Gram-negativas: acil-homoserinas lactonas (AI-1)

O primeiro sistema de QS descrito foi em *Vibrio fischeri*, uma espécie simbiote que proporciona luminescência ao seu hospedeiro eucariótico marinho (NEASLON e HASTINGS, 1970). A emissão de luz depende da transcrição do operon da luciferase, que ocorre quando a densidade celular é alta o suficiente para produzir o acúmulo do autoindutor, uma acil homoserina lactona (AHL). A biossíntese de AHL é controlada pelo gene *luxI*. Atingida uma concentração crítica, o autoindutor se liga à proteína LuxR e o complexo resultante ativa a transcrição dos genes alvo por meio da ligação ao operon da luciferase em uma região chamada box lux (LAZDUNSKI et al., 2004).

Os homólogos LuxI e LuxR são encontrados em diversas espécies de *Proteobacterias*, incluindo as bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas, vibrios marinhos, bactérias da rizosfera, comensais entéricos e patógenos oportunistas de plantas e animais. Os homólogos de LuxI e LuxR presentes nessas espécies regulam diversas funções, como a síntese de enzimas extracelulares, conjugação, produção de antibiótico, luminescência e formação de biofilmes (GREENBERG, 2000; PARSEK e GREENBERG, 2000).

Os mecanismos de QS mais estudados são os encontrados nas *Proteobacterias* Gram-negativas, que usam os autoindutores conhecidos como homoserinas lactonas aciladas como moléculas-sinal (PARSEK e GREENBERG, 2000). Com poucas exceções, as proteínas que sintetizam esses autoindutores constituem uma família evolutivamente conservada de homólogos conhecidos como sintases de autoindutores LuxI. As proteínas que atuam como elementos de resposta específica para autoindutores formam outra família evolutivamente conservada conhecida como família de reguladores transcricionais LuxR (GRAY e GAREY, 2001; FEDERLE e BASSLER, 2003)

A organização genética da família LuxI/R é tão diversa quanto suas funções. Genes homólogos de *luxI* e *luxR* são identificados em cromossomos bacterianos e em elementos extracromossomais. Como exemplos, têm-se os plasmídeos indutores de simbiose (Sym) e de tumor (Ti) em *Rhizobium* e

*Agrobacterium*, respectivamente. Várias espécies bacterianas contêm homólogos múltiplos de LuxI e ou LuxR para a produção ou detecção de sinais distintos e variados. Homólogos de LuxR podem também permitir a ativação independente de funções gênicas diferentes em resposta ao sinal (MCGOAN et al., 1995).

Em bactérias Gram-negativas, as proteínas tipo LuxI são as enzimas responsáveis pela produção dos autoindutores homoserinas lactonas aciladas específicas (FUQUA et al., 1996).

Cada espécie de bactéria Gram-negativa produz uma AHL ou uma combinação de AHLs, se possuir mais de uma proteína LuxI. Assim, apenas os membros das mesmas espécies reconhecem e respondem ao autoindutor. A detecção da AHL e a subsequente alteração da expressão gênica são mediadas pela proteína LuxR (ENGBRECHT, 1983) (Figura 2). Após síntese da AHL dirigida por LuxI, esse autoindutor difunde-se livremente pela célula (KAPLAN e GREENBERG, 1985). Assim, a concentração de AHL no meio extracelular torna-se equivalente àquela presente no meio intracelular, sendo que esse fenômeno aumenta proporcionalmente com o aumento da densidade celular. Uma vez atingida a concentração crítica, o autoindutor liga-se à proteína LuxR. Após a interação com a AHL cognata, a proteína LuxR liga-se a um promotor específico do DNA e ativa a transcrição dos genes alvo (FUQUA et al., 1994). A interação entre a AHL e a proteína LuxR é altamente específica e, por isso, parece limitar a comunicação interespecie em populações que usam a comunicação mediada por AHL- LuxR (FEDERLE e BASSLER, 2003).

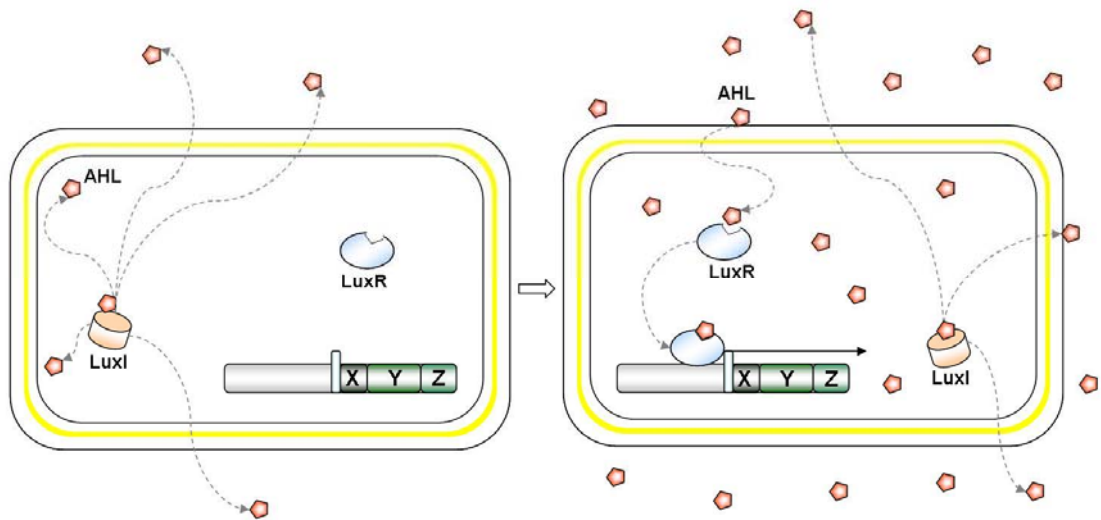


Figura 2 – Modelo de QS em bactérias Gram-negativas. As AHLs (pentágonos vermelhos) são sintetizadas por proteínas tipo LuxI e são detectadas por proteínas tipo LuxR. AHLs difundem-se livremente pela célula e concentram-se no ambiente em proporção ao aumento da população. As proteínas LuxR, quando ligadas ao autoindutor, ligam-se ao promotor específico do DNA e ativa a transcrição de genes alvo (*xyz*).

### 1.2.1.2. Em bactérias Gram-positivas: peptídeos curtos

As bactérias Gram-positivas não fazem uso de AHLs para se comunicarem, mas produzem e transportam oligopeptídeos autoindutores em seu ambiente (Figura 3). Esses oligopeptídeos também são conhecidos como peptídeos autoindutores (PAIs) e, tipicamente, consistem da seqüência de 5 a 17 aminoácidos, algumas vezes contendo modificações não-usuais na cadeia (LAZAZZERA e GROSSMAN, 1998). Outro contraste com o sistema das Gram-negativas é que a membrana não é permeável a AIPs, sendo necessária a existência de transportadores de superfície celular para facilitar a secreção no ambiente externo. A detecção de AIPs é mediada por sistemas de transdução de dois componentes (FEDERLE e BASSLER, 2003).

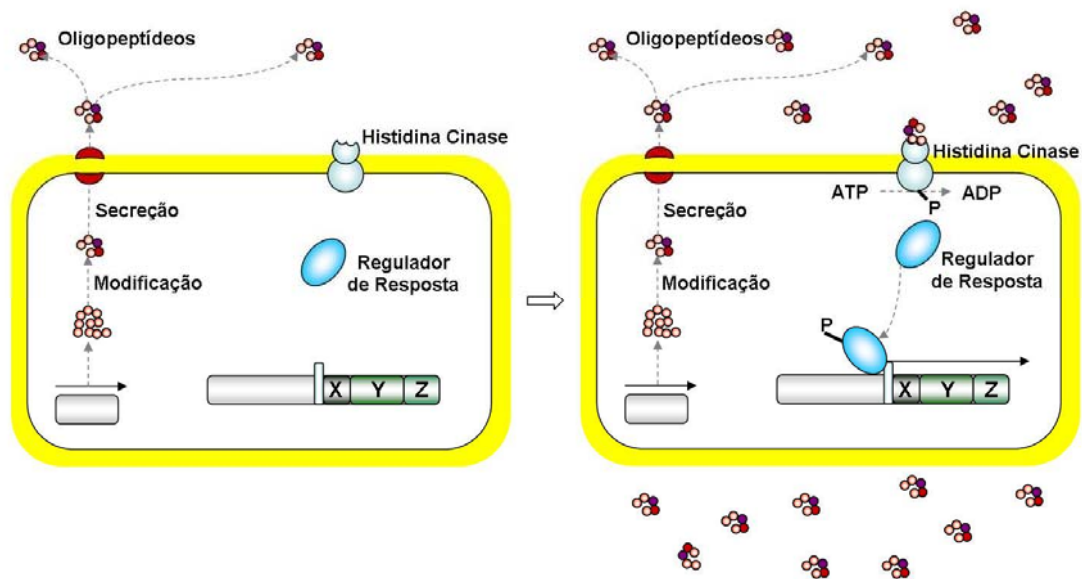


Figura 3 – Modelo de *quorum sensing* em bactérias Gram-positivas. As bactérias sintetizam oligopeptídeos (pequenos círculos rosa em forma de colar) que são tipicamente modificados em aminoácidos específicos e são secretados ativamente. A detecção ocorre via circuito de transdução de sinal de dois componentes e leva à fosforilação de uma proteína regulatória de resposta a qual pode ligar-se ao DNA e regular a transcrição dos genes alvo (*xyz*).

Os sistemas de dois componentes existem em uma ampla variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Esses circuitos são responsáveis por detectar flutuações de vários tipos no ambiente externo e transduzir a informação sensorial para a célula em resposta às flutuações do ambiente (MADIGAN et al., 2000). Os sistemas de dois componentes bacterianos funcionam por meio de uma cascata de fosforilação e envolvem um sensor cinase e um par regulador de resposta. O sensor cinase tem resíduos de histidina invariáveis e os reguladores de resposta contêm resíduos de ácido aspártico invariáveis. Esses resíduos são os sítios da fosforilação (MADIGAN et al., 2000). A organização do domínio molecular dos circuitos de dois componentes pode variar, e esses circuitos podem ser compostos de dois, três ou quatro pares de proteínas. Alguns circuitos de dois componentes são apresentados na Figura 4. O componente final do circuito, o regulador de resposta, é usualmente uma proteína que se liga ao DNA e, quando fosforilada, altera a expressão dos genes-alvo (HAKENBECK e STOCK, 1996). Os AIPs são os ligantes para os sensores cinases de dois componentes e a cascata

de fosforilação transmite informação em cadeia para a célula sobre a densidade populacional. Como na sinalização regulada por AHL, as diferenças entre os ligantes e, nesse caso, a diferença entre as seqüências dos AIPs, conferem especificidade a esse sistema de comunicação (FEDERLE e BASSLER, 2003).

### 1.2.1.3. Linguagem universal: furanosil borato diéster (AI-2)

Enquanto o QS espécie-específico aparentemente permite o reconhecimento da molécula sinal dos próprios membros de uma população, parece provável que as bactérias também precisem de um mecanismo para detectar a presença de outras espécies. A evidência para a existência desse tipo de mecanismo complexo surgiu a partir de estudos com a bactéria luminescente *Vibrio harveyi*, patogênica de camarão. Análises genéticas do circuito de QS revelaram que essa bactéria usa dois sinais autoindutores diferentes para regular a produção de luz. Nesse circuito regulatório, parece que um sinal é usado para a comunicação intraespécie, e o segundo para interespécie (FEDERLE e BASSLER, 2003).

Em *V. harveyi*, o sistema LuxI/R está ausente e a produção de luz é controlada por duas vias paralelas não-homólogas (BASSLER et al., 1993). Em uma delas, o autoindutor não é uma AHL, mas um furanosil borato diéster (CHEN et al., 2002), cuja síntese é controlada pelo gene *luxS*, e o receptor é um sensor cinase de membrana, LuxQ (Figura 4).

Esse indutor é encontrado em um grande número de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo alguns patógenos (SURETTE et al., 1999; MILLER e BASSLER, 2001). Visto que esse autoindutor e sua via biossintética são os mesmos entre todas as espécies que possuem *luxS*, é provável que esse sistema poderia ser usado na comunicação interespécie (MOK et al., 2003). Em algumas espécies, *luxS* está relacionado a funções regulatórias, como o controle da produção da toxina em *Clostridium perfringens* (OHTANI et al., 2002) e da cascata de virulência em *Vibrio cholerae* (SURETTE et al., 1999; MILLER et al., 2002), mas a verdadeira função desse autoindutor em muitas bactérias permanece obscura (LERAT e MORAN, 2004).

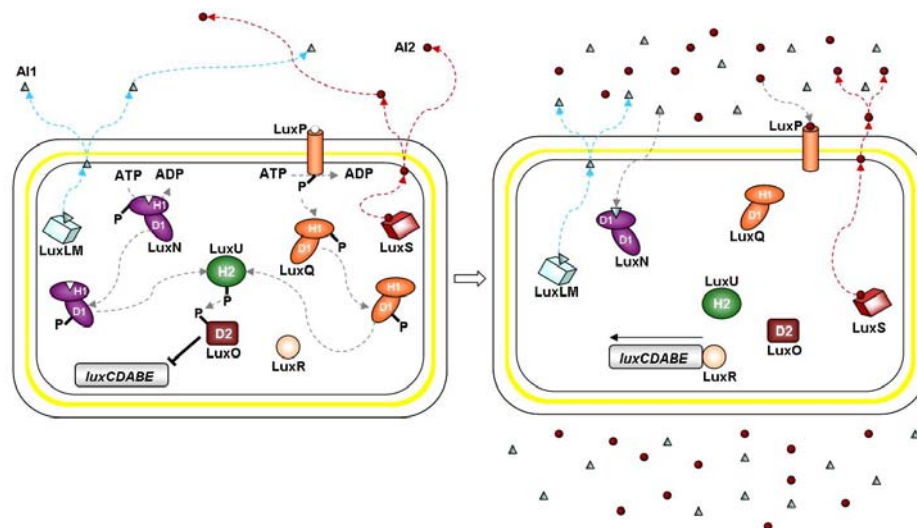


Figura 4 – *Quorum sensing* em *Vibrio harveyi*. Dois sistemas de dois componentes paralelos detectam AI-1 (triângulos azuis), uma AHL sintetizada por LuxLM e AI-2 (círculos vermelhos), um furanosil borato diéster, que é sintetizado por LuxS. Na ausência do autoindutor, o sensor age como cinase e se autofosforila em um resíduo de histidina conservado, H1, e o fosfato é transferido para um resíduo de aspartato conservado, D1, no domínio regulador de resposta. O fosfato é seqüencialmente transferido para o resíduo de histidina (H2) da fosfotransferase LuxU e então para o aspartato conservado (D2) do regulador de resposta LuxO. LuxO fosforilado indiretamente reprime a transcrição de *luxCDABE* que codifica luciferase. A ligação do autoindutor por LuxN e LuxPQ leva à desfosforilação de LuxU e LuxO. A desfosforilação de LuxO elimina a repressão de *luxCDABE*. Para a expressão de *luxCDABE*, é requerido um ativador transcricional chamado LuxR (não-similar a LuxR na Figura 2).

Em *V. harveyi*, o sinal AHL é sintetizado pela proteína LuxLM (Figura 4), que não partilha nenhuma homologia com a família LuxI das sintases de AHL. Entretanto, LuxLM realiza as mesmas tarefas que LuxI. Essas enzimas catalisam a ligação da molécula acil, transportada por uma proteína carreadora de acil (acil-ACP), com a molécula homocisteína de S-adenosilmetionina (SAM). AI-1 é detectado por um regulador de resposta cinase, a proteína LuxN (BASSLER et al., 1993). O segundo sinal de *V. harveyi* é um furanosil borato diéster (AI-2) o qual é sintetizado pela enzima LuxS (SCHAUDER et al., 2001).

Exemplos de fenótipos regulados por LuxS/AI-2 podem ser observados na Tabela 1 e de bactérias que possuem o gene *luxS* estão citados na Tabela 2.

Tabela 1 – Exemplos de bactérias e seus fenótipos regulados por LuxS/AI-2

<b>Espécie</b>	<b>Função</b>	<b>Referências</b>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Virulência, aquisição de ferro	Fong et al. (2001); Fong et al. (2003)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Motilidade	Elvers e Park (2002)
<i>Clostridium perfringens</i>	Produção de toxina	Ohtani et al. (2002)
<i>Escherichia coli</i> W3110	Divisão celular, motilidade, metabolismo	DeLisa et al. (2001)
<i>Escherichia coli</i> , EHEC e EPEC	Virulência	Sperandio et al. (1999); Sperandio et al. (2001)
<i>Neisseria meningitides</i>	Infecção	Winzer et al. (2002)
<i>Photobacterium luminescens</i>	Produção de antibiótico carbapenem	Derzelle et al. (2002)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Formação de biofilme, aquisição de ferro, produção de protease	Chung et al. (2001); McNab et al. (2003); Burges et al. (2002)
<i>Salmonella Typhi</i>	Formação de biofilme	Prouty et al. (2002)
<i>Shigella flexneri</i>	Fator de transcrição associado com virulência	Day e Maurelli (2001)
<i>Streptococcus mutans</i>	Formação de biofilme	Merrit et al. (2003)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virulência	Stroehrer et al. (2003)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Expressão de fator de virulência	Lyon et al. (2001)
<i>Vibrio cholerae</i>	Expressão de fator de virulência	Miller et al. (2002); Zhu et al. (2002)
<i>Vibrio harveyi</i>	Luminescência, produção de protease, secreção tipo III, morfologia da colônia, produção de sideróforo	Bassler et al. (1994); Lilley e Bassler (2000); Mok et al. (2003)
<i>Vibrio vulnificus</i>	Virulência	Kim et al. (2003)

Fonte: Federle e Bassler (2003).

Tabela 2 – Exemplos de espécies bacterianas que possuem o gene *luxS*

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Borrelia longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Clostridium acetobutyricum</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Porfiromonas gengivalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Haemophilus sommus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Yersinia pestis</i>

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; Fonte: Federle e Bassler (2003).

Os genes relacionados ao QS são distribuídos de modo descontínuo entre as bactérias (SURETTE et al., 1999; MILLER e BASSLER, 2001), o que sugere que eles têm sido perdidos por transferência horizontal de genes. Estudos filogenéticos podem mostrar se eles são ancestrais e perdidos em algumas espécies ou se foram adquiridos de espécies distantemente relacionadas. O conhecimento dos mecanismos evolucionários de tais genes é de particular importância, uma vez que eles são considerados como alvos potenciais para novas estratégias antimicrobianas.

### 1.2.2. Vantagens do sistema *quorum sensing* para as bactérias

De acordo com alguns microbiologistas, o QS evoluiu simplesmente porque permite às bactérias coordenarem o comportamento do grupo e comportarem-se como organismos multicelulares. Entretanto, o papel das moléculas sinalizadoras de QS na comunicação célula-célula é ainda questionado. Sugere-se que os autoindutores funcionam como sondas para provimento de células individuais com informações sobre as propriedades do ambiente imediato (REDFIELD, 2002). As

vias de sinalização podem ter evoluído por outras razões, além da sinalização celular, ou podem ter adquirido novas funções desde que foram estabelecidas (KELLER e SURETTE, 2006).

A percepção do ambiente pelas bactérias pode direcionar a diferenciação celular por meio da expressão de genes que controlam uma variedade de vias biológicas. Por exemplo, alguns sistemas podem ser usados para decidir a migração para ambientes mais satisfatórios com maior disponibilidade de nutrientes ou para que a bactéria adote novos modos de crescimento, como a formação de biofilmes, de acordo com a densidade celular (RUMJANEK et al., 2004). Esse comportamento coletivo pode ser vantajoso e garantir a sobrevivência celular. Como os microrganismos apresentam diversidade metabólica e são capazes de ocupar todos os nichos onde a vida é termodinamicamente possível, as vantagens advindas da atuação de bactérias como organismos multicelulares interessam a diferentes áreas do conhecimento, entre elas a Medicina e a Agronomia. Nessas áreas, a natureza do comportamento celular pode resultar na formação de simbioses e associações benéficas ou adversas e causar estados patogênicos por meio da regulação de fenótipos específicos (RUMJANEK et al., 2004).

Os sinais moleculares, também chamados de autoindutores ou feromônios, regulam genes específicos que caracterizam o comportamento multicelular e propiciam, dessa maneira, a exploração do ambiente de maneira muito mais eficiente do que seria possível a células individuais. Densidades populacionais muito baixas de estirpes patogênicas, por exemplo, teriam chance limitada de superar os sistemas de defesa do hospedeiro animal ou vegetal e promover, com sucesso, um ataque a esses organismos. Nesse caso, o retardamento na expressão dos fatores de virulência pelo agente patogênico até atingir o número suficiente de células pode ser uma estratégia altamente interessante, uma vez que o sistema de defesa do organismo só seria ativado quando a interação entre os dois organismos estivesse mais favorável ao agente patogênico. De modo similar, bactérias benéficas responsáveis pela fixação de nitrogênio podem empregar esse mecanismo para otimizar a formação de nódulos nas raízes das plantas. Bactérias capazes de produzir substâncias antagonistas que atuam como agentes de biocontrole, matando ou inibindo a multiplicação de microrganismos fitopatogênicos, também se beneficiam do mecanismo de QS. Nesse caso, as substâncias antagonistas são produzidas apenas quando uma densidade populacional crítica da bactéria é atingida, reduzindo as chances de seleção de

formas de resistência do patógeno, o que dificultaria o controle dessas populações (RUMJANEK et al., 2004).

### **1.2.3. Mecanismos de inibição do sistema *quorum sensing***

Embora as AHLs possam se acumular como resultado de um simples aumento no número de células, outros fatores podem também influenciar a concentração ambiental dessas moléculas. A agregação de bactérias, a formação de biofilmes e o confinamento físico podem contribuir para o aumento da concentração local de AHLs (REDIFIELD, 2002). A constatação de que 3-oxo-C6-HSL de *V. fischeri* difundia-se livremente pela membrana celular mostrou que a distribuição dessa molécula era dependente do gradiente de concentração através da membrana bacteriana (KAPLAN e GREENBERG, 1985). Entretanto, com a identificação de AHLs de cadeia longa, a idéia de que as AHLs difundem-se livremente passou a ser questionada (GONZÁLEZ e MARKETON, 2003). De particular importância foi o estudo realizado por Pearson et al. (1999), demonstrando que a AHL 3-oxo-C12-HSL produzida por *P. aeruginosa* ultrapassa a membrana por meio de transporte ativo, por meio de uma bomba de efluxo codificada pelo operon *mexAB-oprM*, membro de uma grande família de transportadores de antibióticos. Na ausência dessa bomba, as moléculas foram capazes de difundirem-se pela membrana, mas de modo ineficiente. Assim, a concentração intracelular da molécula sinal foi muito maior do que a extracelular.

Embora o transporte ativo de AHL tenha sido constatado apenas em *P. aeruginosa*, pesquisas demonstram um número grande de bactérias que sintetizam moléculas de cadeia longa, mas ainda não se sabe da ocorrência de bombas similares a MexAB nessas bactérias (GONZÁLEZ e MARKETON, 2003).

Existe um grande interesse em desenvolver sistemas para interromper ou manipular o processo de sinalização célula-célula em bactérias, utilizando-se compostos análogos ou antagonistas de QS ou, ainda, enzimas que degradem as moléculas sinalizadoras, a fim de alterar comportamentos regulados por QS. A aplicação desses antagonistas poderia ser útil para controlar o crescimento ou inibir

os mecanismos de virulência das bactérias em diferentes ambientes, incluindo os alimentos (SMITH et al., 2004; PILLAI e JERUDHASAN, 2006).

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). As enzimas que degradam AHLs foram originalmente identificadas em diversas bactérias (Tabela 3), mas são também encontradas em hospedeiros eucarióticos (XU et al. 2003; CHUN et al., 2004). Assim, a interferência da sinalização por eucariotos pode representar um determinante adicional da resposta imune inata (CROXATTO, 2006). A síntese química dessas enzimas seria uma alternativa interessante para que elas façam parte da composição de detergentes utilizados na indústria, o que aumenta a possibilidade de remoção de biofilmes (SMITH et al., 2004).

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

Pesquisas em bancos de dados para 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). Apesar do número de estudos ser crescente, ainda não está completamente esclarecida a verdadeira função que essas enzimas desempenham em seu nicho ecológico natural. Obviamente, existe um *turnover* de AHL no ambiente; caso contrário, o acúmulo de AHL poderia fazer com que o QS fosse redundante, visto que esse sistema baseia-se no fato de a concentração de AHL ser reflexo da densidade da população.

Um exemplo de outro 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 com base na sua capacidade de utilizar AHLs como única fonte de carbono e energia, uma atividade que pode romper o processo de sinalização de outras bactérias que partilham o mesmo ambiente .

Tabela 3 – Exemplos de microrganismos capazes de degradar moléculas de homoserinas lactonas aciladas

Espécies	Gene	Atividade	Observações	Referência
<i>Bacillus</i> sp. 240 B1	<i>aiiA</i>	Lactonase	Degrada OHHL, ODHL, OOHL	Dong et al. (2000)
Estirpes de <i>Bacillus</i> COT1, estirpes de <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i>	Homólogos <i>aiiA</i>	Lactonase	Degradam OHHL com eficiências diferenciadas	Dong et al. (2002)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (subespécies numerosas)	Homólogos <i>aiiA</i>	Lactonase	Degradam OHHL com eficiências diferenciadas	Lee et al. (2002)
<i>Arthrobacter</i> sp. IBN 110	<i>ahID</i>	Lactonase	Degrada OHHL, OHL, OdDHL, BHL, HHL, DHL	Park et al. (2003)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>attM</i> , <i>aiiB</i>	Lactonase	Degrada OOHL, HHL, <i>aiiB</i> menos ativa	Zhang et al. (2002); Carlier et al. (2003)
Estirpes de <i>Variovorax paradoxus</i> VAI-C	ND	Acilase	Cresce em ampla faixa de AHLs com diferentes eficiências	Leadbetter e Greenberg (2000)
Estirpe de <i>Ralstonia</i> XJ12B	<i>aiiD</i>	Acilase	Degrada OdDHL, ODHL, OHHL, BHL	Lin et al. (2003)
Estirpe de <i>Pseudomonas</i> AI-A, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Acilase não identificada <i>pvdQ</i>	Acilase	Ambas as estirpes podem degradar cadeias de AHL longas (maior que 6 C), mas não degradam cadeias curtas.	Huang et al. (2003)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Variovorax</i> sp., <i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Comamonas</i> sp., <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>	ND	ND	Degradam uma faixa de AHLs, exibindo diferenças em eficiência entre derivados oxo e não oxo.	Uroz et al. (2003)

ND, Não Determinado

Uma variedade de análogos de AHL foi testada como agonistas ou antagonistas de QS. As furanonas halogenadas produzidas pela macroalga *Delisea pulchra* interferem no QS e afetam a motilidade de *Serratia liquefaciens* (GIVSKOV et al., 1996). A elucidação do mecanismo de inibição observado em alguns análogos de AHL é de grande interesse em virtude dos estudos que sugerem que as AHL funcionam como estabilizadores de proteínas LuxR instáveis (ZHU e WINANS, 2001). Algumas furanonas sintéticas e outros compostos estruturalmente relacionados também exercem influência sobre o QS (MARTINELLI et al., 2004) já foram testadas *in vitro* (REN et al., 2001; HENTZER et al., 2002) e *in vivo*, em modelo de infecção em pulmão de rato (HENTZER et al. 2003). Manefield et al. (2002) revisaram alguns de seus dados (MANEFIELD et al., 1999) e demonstraram que as furanonas aumentam o *turnover* de LuxR, ao invés de remover a AHL de LuxR. Os autores sugeriram que as furanonas halogenadas produzem mudanças conformacionais que resultam em degradação proteolítica rápida do complexo LuxR/AHL. Entretanto, o mecanismo estrutural preciso pelo qual as furanonas estimulam o *turnover* de LuxR permanece obscuro, principalmente dado o fato de que as furanonas que não possuem cadeia acilada parecem ser mais ativas do que aquelas que as contêm. O efeito inibitório também ocorre em bactérias que não utilizam sistemas LuxI/LuxR, o que indica que as furanonas podem interferir em outros aspectos do QS além da inativação dos homólogos LuxR. Por exemplo, furanonas inibem o QS em bactérias Gram-positivas como *Bacillus anthracis*, a sinalização via AI-2 em *E. coli* e em *V. harveyi* e a sinalização via autoindutor-1 em *V. harveyi* (REN et al., 2001; REN et al., 2004; JONES et al., 2005).

Em alguns casos, as AHLs por si mesmas atuam como antagonistas de QS. Por exemplo, a estirpe *Chromobacterium violaceum* produz o pigmento violaceína quando a AHL de cadeia curta C6-AHL é produzida. Entretanto, a produção de pigmento é inibida por cadeias de AHL contendo dez ou mais carbonos (MCCLEAN et al., 1997).

A degradação ou a inibição do sinal não é usada apenas para interferir com o sistema de sinalização de estirpes competitivas ou patogênicas, mas também para regular a sinalização por QS da estirpe produtora da enzima que degrada AHL. *A. tumefaciens* produz uma lactonase AttM que está envolvida na regulação da transferência do plasmídeo conjugativo Ti por QS (ZHANG et al., 2002; ZHANG et al., 2004). O acúmulo de AHL e a taxa de transferência do plasmídeo Ti seguem o

mesmo padrão durante o crescimento celular com o máximo alcançado no meio da fase exponencial de crescimento, e desaparece rapidamente quando a célula entra na fase estacionária. A degradação rápida de AHL está relacionada à expressão induzida de AttM e ocorre antes que a bactéria atinja a fase estacionária (ZHANG et al., 2002).

O *turnover* não-enzimático de AHLs ocorre em condições *in vitro* como resultado de lise do anel lactona em resposta a elevações de pH e temperatura (BYERS et al., 2002; YATES et al., 2002). As AHLs e seus produtos de hidrólise podem ser utilizados como fonte de carbono por muitos microrganismos e estes são comumente encontrados em muitos ambientes (ROCHE et al., 2004).

Uma vez que diversas bactérias que se associam a organismos eucariotos regulam fenótipos como motilidade, virulência, produção de enzimas extracelulares, produção de exopolissacarídeos e antibióticos por meio do QS, existe potencial para os hospedeiros eucarióticos romperem esse sistema regulatório pela produção de homólogos de sinais de QS. Dessa forma, seria possível protegerem-se de patógenos, ao promoverem a modificação do comportamento bacteriano. Ervilha (*Pisum sativum*) e outras plantas superiores produzem compostos que imitam moléculas sinalizadoras e interferem com o comportamento regulado por QS de várias espécies bacterianas (TEPLITSKI et al., 2000).

Desde a descoberta das homoserinas lactonas aciladas, muitos investigadores realizaram análises para relacionar a estrutura da molécula com a sua atividade, tendo como foco inicial a cadeia acilada (EBEHARD et al., 1986; SCHAEFER et al., 1996; PASSADOR et al., 1996; ZHU et al., 1998). Esses estudos demonstraram que (1) o comprimento da cadeia acilada pode ser alterado com efeito mínimo na atividade; (2) mudanças dramáticas no comprimento da cadeia ou no ligante da terceira posição eliminam atividade; (3) é requerido que a cadeia acil seja linear. O autoindutor de TraR, N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona, pode ser convertido em um antagonista de eficiência similar simplesmente por substituição do grupo carbonil na terceira posição por um metileno para formar N-(octanoil)-L-homoserina lactona o que leva à conclusão de que o grupo 3-oxo não é necessário para a ligação a TraR, mas tem participação importante na ativação de TraR (ZHU et al., 1998).

O estudo realizado por REVERCHON et al. (2002) envolveu a síntese de 22 moléculas de homoserinas lactonas aciladas contendo várias substituições na

quarta posição da cadeia acilada de N-(3-oxo-hexanoil)-L- homoserina lactona. Esses análogos foram então avaliados para a ativação ou inibição da bioluminescência em *V. 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.

Os trabalhos realizados por OLSEN et al. (2002) e SMITH et al. (2003) exploraram os efeitos da adição de substituintes ou da alteração do tamanho do anel das homoserinas lactonas. Moléculas com substituintes nas posições três e quatro do anel de 3-oxo-C8-HSL foram sintetizadas com base nas similaridades estruturais das AHLs com as furanonas. Todas elas foram testadas quanto a sua atividade em um sistema repórter de QS baseado em LuxR. Os análogos 3-hidroxi cis ou trans apresentaram-se como ativadores muito fracos apenas em altas concentrações e foram também inibidores em altas concentrações, o que levou à especulação de que agem como agonistas parciais ou de modo não específico. Por outro lado, os análogos 4-hidroxi cis ou trans foram ativadores (OLSEN et al., 2002). Em outro estudo, análogos do autoindutor 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* foram construídos, o que permitiu a identificação de um novo agonista, 3-oxo-C(12)-(2-aminociclohexanol), capaz de ativar a proteína LasR como um fator de transcrição. Verificou-se, também, que modificações estruturais nos agonistas produziram compostos com atividade antagonista sendo capazes de reduzir significativamente a produção de fatores de virulência e a formação de biofilmes (SMITH et al., 2003).

#### **1.2.4. Quorum sensing em bactérias contaminantes de alimentos**

Os alimentos representam sistemas microbianos complexos e a sua microbiota susceptível a várias condições de estresse e mudanças ambientais que ativam a expressão de genes (ARCHER, 1996). Smith et al. (2004) afirmaram ser provável a ocorrência do QS em bactérias deterioradoras e patogênicas nos alimentos.

Alguns estudos encontrados na literatura apresentam especulações de que moléculas de AHL poderiam estar implicadas 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). GRAM et al. (1999) constataram produção de 3-oxo-N-hexanoil-homoserina lactona e de algumas moléculas análogas por 116 de 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 N<sub>2</sub>. JAY et al. (2003) sugeriram que o QS desempenha uma função na deterioração de carne *in natura* sob baixas temperaturas. AHLs foram extraídas e detectadas em amostras de carne embalada a vácuo. Dentre as 96 bactérias isoladas desse alimento, 92 foram identificadas como enterobactérias, sendo *Hafnia alvei* a espécie predominante produtora de AHL. Quando a carne a vácuo foi inoculada com a estirpe de *H. alvei* selvagem ou mutante para a produção de molécula sinalizadora, C6-oxo-HSL, não foi observada diferença na deterioração (BRUHN et al., 2004). Entretanto, quando *H. alvei* selvagem foi co-inoculada em leite com a estirpe deficiente na produção de AHL *Serratia 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).

A fim de avaliar a produção de AHLs por 148 bactérias Gram-negativas isoladas de alimentos, RAVN et al. (2001) utilizaram os sistemas monitores *Escherichia coli* pSB403, *Agrobacterium tumefaciens* A136 e *Chromobacterium violaceum* CV026 no ensaio de indução e de inibição do pigmento violaceína e verificaram que 147 delas apresentaram resultado positivo.

WHAN et al. (2000) sugeriram que o QS participa da regulação da atividade hidrolítica em *Pseudomonas* deterioradoras de leite. Porém, apenas um resumo publicado no Annual Meeting Book of Abstracts do Institute of Food Technologists (IFT) com estudo relacionado ao fato foi encontrado na literatura (LIU e GRIFFITHS, 2003). CHRISTENSEN et al. (2003) demonstraram que diversas enzimas hidrolíticas sintetizadas por *S. proteamaculans* B5a, uma bactéria

deterioradora de alimentos, são reguladas pelo QS. Esses autores demonstraram ainda que o QS está envolvido na deterioração *in situ* em leite. DUNSTALL et al. (2005) avaliaram o efeito de nove AHLs sintéticas no crescimento de *P. fluorescens* isoladas de leite e verificaram que N-benzoiloxycarbonil-L-homoserina lactona e N-3-oxihexanoil-DL-homoserina lactona reduziram a duração da fase lag e aumentaram a taxa de crescimento das três estirpes avaliadas. A detecção de AHLs produzidas por 45 das 53 bactérias psicrotóxicas proteolíticas isoladas de leite, incluindo estirpes de *P. fluorescens*, *H. alvei* e *Aeromonas hydrophila*, demonstrou que essas moléculas são comumente produzidas por essas espécies (PINTO et al., 2006) e, portanto, podem desempenhar funções importantes na regulação de diferentes fenótipos.

MELINA-MARTINEZ et al. (2006) avaliaram a influência de condições de sistemas alimentares na produção de AHLs por 13 estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de alimentos incluindo carne, salmão, bacon e vegetais e verificaram que 11 delas produziram AHLs, em particular C4-HSL, em várias temperaturas, valores de pH e concentrações de NaCl comumente encontradas em alimentos.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que relacionem a formação de biofilmes por bactérias isoladas de alimentos com o sistema QS. Portanto, o estudo do QS e de sua relação com bactérias deterioradoras de alimentos faz-se necessário para que haja melhor compreensão do efeito desse sistema na ecologia de alimentos e na formação de biofilmes. Este conhecimento poderá contribuir para a geração de novas estratégias para o controle do crescimento de bactérias indesejáveis e da produção de metabólitos prejudiciais nos alimentos, contribuindo para a preservação e garantia de qualidade destes produtos.

### 1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. L., McLEAN, R.J. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4285-4287, 1999.

ALLISON, D.G., RUIZ, B., SanJOSE, C., JASPE, A. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 179-184, 1998.

AN, D., DANHORN, T., FUQUA, C., PARSEK, M.R. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm co cultures. **Proceedings National Academy Science**, v. 103, n.10, p. 3828-3823, 2006.

ANDERSEN, J. B., HEYDORN, A., HENTZER, M, EBERL, L., GEISENBERGER, O., CHRISTENSEN, B. B. *gfp* based N-acylhomoserine lactone sensor systems for detection of bacterial communication. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 575-585, 2001.

ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

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.

AREVALO-FERRO, C., REIL, G., GÖRG, A., EBERL, L., Riedel, K., Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics. **Systematic and Applied Microbiology**, 2006. In press.

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.

BATCHELOR, S.E., COOPER, M, CAHHABRA, S.R., GLOVER, L.A., STEWART, G.S.A.B., WILLIAMS, P., PROSSER, J.J. Cell-density regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2261-2266, 1997.

BEULING, E.E., van den HEUVEL, J.C., OTTENGRAF, S.P.P. Diffusion coefficients of metabolites in active biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n.1, p. 53-60, 2000.

BOWER, C. K., Mc GUIRE, J., DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1996.

BOYD, A., CHAKRABARTY, A.M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 2355-2359, 1994.

BRANDA, S.S., GONZALEZ-PASTOR, J.E., BEN-YEHUDA, S., LOSICK, R., KOLTER, R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 98, p. 11621-11626, 2001.

BRANDA, S.S., VIK, A., FRIEDMAN, L., KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n.1, p.20-25, 2005.

BROWN, C.M., EILWOOD, D. C., HUNTER, J.R. Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, p. 163-166, 1977.

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.

BURGESS, N.A, KIRKE, D.F, WILLIAMS, P., WINZER, K., HARDIE, K.R., MEYERS, N.L, ADUSE-OPOKU, J.,CURTIS, M.A, CÁMARA, M. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and hemagglutinin activities but is not essential for virulence. **Microbiology**, v. 148, p. 763-772, 2002.

BYERS, J.T., LUCAS, C., SALMOND, G.P., WELCH, M. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1163-1171, 2002.

CARLIER, A., UROZ, S., SMADJA, B., FRAY, R., LATOUR, X., DESSAUX, Y., FAURE, D. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-acyl homoserine lactonase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4989–4993, 2003.

CERI, H., OLSON, M., MORCK, D., STOREY, D., READ, R., BURET, A., OLSON, B. The MBEC assay system: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Methods in Enzymology**, v. 337, p. 377-385, 2001.

CHARLTSTON, T. S., de NYS, R., NETTING, A., KUMAR, N., HENTZER, M., GIVSKOV, M., KJELLEBERG, S. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. **Environmental Microbiology**, v. 2, p.530-541, 2000.

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.

CHIGO, J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**, v.412, p.442-445, 2001.

CHIRVA, N. T., HERRINGTON, M.B. CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltransferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. **Microbiology**, v. 149, p.525-535, 2003.

CHMIESLEWSKI, R.A.N., FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 22-30, 2003.

CHUN, C.K., OZER, E.A., WELSH, M.J., ZABNER, J., GREENBERG, E.P. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. **Proceedings National Academy Science U S A**, v. 101, p. 3587-3590, 2004.

CHUNG, W.O., PARK, Y., LAMONT, R.J., MCNAB, R., BARBIERI, B, DEMUTH, D.R. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3903–3909, 2001.

COOKSEY, K.E., WIGGLESWORTHCOOKSEY, B. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea - a Review. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 9, n.1, p. 87-96, 1995.

COSTERTON, J.W., GEESEY, G., CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n.1, p. 86-95, 1978.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.R. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W., LEWADOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORVER, D., JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137-2142, 1994.

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.

CROSSMAN, L., DOW, J.M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes Infection**, v. 6, p. 623-629, 2004.

CROXATTO, A. Van T, a central regulator of quorum sensing signaling in *Vibrio anguillarum*. 97p. Thesis (PhD in Molecular Biology) – Department of Molecular Biology, Umea University, Sweden, 2006.

DAVEY, M. E., CAIAZZA, N.C., O'Toole, G.A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 1027-1036, 2003.

DAVEY, M.E., O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbial Molecular Reviews**. v. 64, p. 847-867, 2000.

DAVIES, D.G., GEESEY, G.G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 860-867, 1995.

DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P, IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J. W., GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

DAY, W.A., MAURELLI, A.T. *Shigella flexneri* LuxS quorum-sensing system modulates *virB* expression but is not essential for virulence. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 15–23, 2001.

De BEER, D., HEUVEL, J.C.V., OTTENGRAF, S.P.P. Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 573-579, 1993.

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.

De KIEVIT, T.R., GILLIS, R., MARX, S., BROWN, C. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas* biofilms: their role and expression patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1865-1873, 2001.

DeLISA, M.P., WU, C.F., WANG, L., VALDES, J.J., AND BENTLEY, W.E. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2- stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5239–5247, 2001.

DERZELLE, S., DUCHAUD, E., KUNST, F., DANCHIN, A., BERTIN, P. Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photobacterium luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3780–3789, 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. 97, 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.

DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277-281, 2001.

DOREL, C., VIDAL, O., PRINGENT-COMBARET, C., VALLET, I., LEJEUNE, P. Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, p. 169-175, 1999.

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.

ELASRI, M.O., MILLER, R.V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2025-2031, 1999.

ELVERS, K.T., PARK, S.F. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a *luxS* encoded signaling molecule. **Microbiology**, v. 148, p. 1475–1481, 2002.

EHLERS, L.J., BOUWER, E.J. Rp4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. **Water Science Technology**, v. 7, n.8, p. 163-171, 1999.

ENGBRECHT, J., NEALSON, K., SILVERMAN, M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. **Cell**, v. 32, p. 773-781, 1983.

FEDERLE, M.J., BASSLER, B.L. Interspecies communication in bacteria. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n.9, p. 1291-1298, 2003.

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.

FONG, K.P., GAO, L., DEMUTH, D.R. *luxS* and *arcB* control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* under iron limitation. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 298–308, 2003.

FONG, K.P., CHUNG, W.O., LAMONT, R.J., DEMUTH, D.R. Intra and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 7625–7634, 2001.

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.

FUQUA, C., WINANS, S. P. Conserved cis-Acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n.2. p. 435-440, 1996.

FUX, C.A., COSTERNON, J. W., STEWART, P. S., STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n.1, p. 34-40, 2005.

GIVSKOV, M.R., de NIS, R., MANEFIELD, GRAN, L., MAXMILIEN, R., EBERL L., MOLIN, S., STEINBERG, P.D., KJELLEBERG, S. Eukaryotic interference with homoserine lactone –mediated prokaryotic signaling. **Journal of Bacteriology**, v.178, p. 6618-6622, 1996.

GONZÁLEZ, J. E., MARKETON, M.M., Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, 4, p. 574–592, 2003.

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.

GRAY, K.M, GAREY, J.R. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. **Microbiology**, v.147, p. 2379-2387, 2001.

GREENBERG, E.P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria. **Journal of Microbiology**, v.38, p.117-121, 2000.

HAKENBECK, R., STOCK, J.B. Analysis of two component signal transduction regulation. **Methods in Enzymology**, v. 273, p.281-300, 1996.

HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 228-233, 2002.

HAUSNER, M., WUERTZ. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3710-3713, 1999.

HENKIN, T.M. The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 35, p. 9-15, 1996.

HENTZER, M., RIEDEL, K., RASMUSSEN, T.B., HEYDORN, A., ANDERSEN, J.B., PARSEK, M.R., RICE, S.A., EBERL, L., MOLIN, S., HOIBY, N., KJELLEBERG, S., GIVSKOV, M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology**, v. 148, p. 87-102, 2002.

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.

HEILMANN, C., SCHWEITZER, O., GERKE, C., VANITTANAKOM, N. MACK, D., GOTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, v.20, p.1083-1091, 1996.

HEYDORN, A., ERSBOLL, B., KATO, J., HENTZER, M., PARSEK, M.R., TOLKER-NIELSEN, T. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2008-2017, 2002.

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.

HUANG, J. J., HAN, J.-I., ZHANG, L.-H., LEADBETTER, J. R. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5941–5949, 2003.

HUBER, B., RIEDEL, K., HENTZER, M., HEYDORN, A., GOTSCHLICH, A., GIVSKOV, M., MOLIN, S., EBERL, L. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v.147, p. 2517-2528, 2001.

HUNG, D.L., RAIVIO, T. L., JONES, C.H., SILHAVY, T. L., HULTGREN, S.J. Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pilli. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.20, p.1508-1518, 2001.

JACKSON, D.W., SIMECKA, J.W., ROMEO, T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 3406-3410, 2002.

JASS, J., WALKER, J. T. Biofilms and biofouling. In: WALKER, J.T., SURMAN, S., JASS, J. **Industrial biofouling - detection, prevention and control**. New York, John Wiley & Sons Ltd, p. 1-12, 2000.

JAY, J.M., VILAI, J.P., HUGHES, M.E., Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 105-111, 2003.

JEFFERSON, K. K. What drives a bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 163-173, 2004.

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.

KAPLAN, H.B., GREENBERG, E.P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. **Journal of Bacteriology**, v.63, 12, p. 1210-1214, 1985.

KELLER, L., SURETTE, M. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews in Microbiology**, v.4, n. 4, p.248-258, 2006.

KIM, S.Y., LEE, S.L., RAN KIM, Y.R., KIM, C.M., RYU, P.Y., CHOY, H.E., CHUNG, S.S., RHEE, J.H. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 1647–1664, 2003.

KJAERGAARD, K., SCHEMBRI, M.A., RAMOS, C., MOLIN, S, KLEMM, P. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental Microbiology**, v.2, p. 695-702, 2000.

KUMAR, C.G., ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

LARKUM, A.W.D., KOCH, E.M.W., KUHL, M. Diffusive boundary layers and photosynthesis of the epilithic algal community of coral reefs. **Marine Biology**, v. 142, n. 6, p. 1073-1082, 2003.

LAZDUNSKI, A.M., VENTRE, I., STURGIS, J.N. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. **Nature**, v. 2, p. 581-592, 2004.

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.

LEE, S.J., PARK, S.Y., LEE, J.J., YUM, D.Y., KOO, B.T., LEE, J.K. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3919–3924, 2002.

LERAT, E., MORAN, N.A. The evolutionary history of quorum sensing systems in bacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n.5, 2004.

LILLEY, B.N., BASSLER, B.L. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 940–954, 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.

LIU, M., GRIFFITHS, M.W. The role of quorum sensing in the regulation of protease by *Pseudomonas fluorescens* and its relation to food spoilage. **IFT Annual Meeting Book of Abstracts**, 29G-26, p. 85, 2003.

LYON, W.R., MADDEN, J.C., LEVIN, J.C., STEIN, J.L., CAPARON, M.G. Mutation of luxS affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 42, p. 145–157, 2001.

LYNCH, M. J., SWIFT, S., KIRKE, D. F., KEEVIT, W., DODD, C. E. R., WILLIAMS, P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 18-28, 2002.

MACHADO, A.D.S. **Atividade proteolítica de *P. fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal**. 74 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall. 9 ed., 2000. 989p.

MAH, T.F.C., O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MANEFIELD, M., de NYS, R., KUMAR, N., READ, R., GIVSKOV, M., STEINEBERG, P., KJELLEBERG, S. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. **Microbiology**, v. 145, p. 283-291, 1999.

MANEFIELD, M., RASMUSSEN, T.B., HENZTER, J.B., ANDERSEN, P., STEINBERG, S., KJELLEBERG, S., GIVSKOV, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. **Microbiology**, v.148, p.1119-1127, 2002.

MARTINELLI, D. GROSSMAN, G., SÉQUIN, U, BRAND, H., BACHOFEN, R. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. **BioMed Central Microbiology**, v. 4, n. 25, 2004.

MARSH, P.D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p.7-15, 2005.

McCLEAN, K.H., WINSON, M.K., FISH, L., TAYLOR, A., CHHABRA, S.R., CAMARA, M., DAYKIN, M., LAMB, J.H., SWIFT, S., BYCROFT, B.W., STEWART, G.S., WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, p. 3703-3711, 1997.

McGOWAN, S. SEBAIHIA, M. JONES, S. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. **Microbiology**, v.141, p. 541-550, 1995.

McNAB, R., FORD, S.K., EL-SABAENY, A., BARBIERI, B., COOK, G.S., LAMONT, R.J. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 274–284, 2003.

MEDINA-MARTINEZ, 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**, 2006. In press.

MERRITT, J., QI, F., GOODMAN, S.D., ANDERSON, M.H., SHI, W. Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1972–1979, 2003.

MEYER, R.L., SAUNDERS, A.M., ZENG, R.J.X., KELLER, J., BLACKALL, L.L. Microscale structure and function of anaerobic-aerobic granules containing glycogen accumulating organisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 3, p. 253-261, 2003.

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.

MOK, K.C., WINGREEN, N.S., BASSLER, B.L. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. **EUROPEAN Molecular Biology Organization Journal**, v. 22, p. 870–881, 2003.

NEALSON, K.H., PLATT, T., HASTINGS, J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v.104, p.313-322, 1970.

OHTANI, K.H., HAYASHI, H. SHIMIZU, T. The luxS gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *Clostridium perfringens*. **Molecular Microbiology**, v.44, p.171-179, 2002.

OKITA, W. B., KIRWAN, D.J. Simulation of secondary metabolite production by immobilized living cells: penicillin production. **Biotechnology Progress**, v. 2, p. 83-90, 1986.

OLSEN, J.A., SEVERINSEN, R., RASMUSSEN, T.B., HENTZER, M., GIVSKOV, M., NIELSEN, J. Synthesis of new 3-and 4-substituted analogues of acyl homoserine lactone quorum sensing autoinducers. **Bioorganic Medical Chemical Letters**, v. 12, p. 325-328, 2002.

O'TOOLE, G. A., GIBBS, K.A, HAGER, P.W., PHIBBS, P. V. Jr, KOLTER, R. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p.425-431, 2000a.

O'TOOLE, G. A, KAPLAN, H.B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000b.

O'TOOLE, G. A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p.295-304, 1998a.

O'TOOLE, G. A., KOLTER, R. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WSC365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 449-461, 1998b.

OTTO, K., SILHAVY, T.J. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 99, p. 2287-2292, 2002.

PARK, S.Y., LEE, S. J., OH, T.K., OH, J.W., KOO, B.T., YUM, D.Y., LEE, J.K. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. **Microbiology**, v. 149, p. 1541–1550, 2003.

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 National Academy Science**, 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.

PEARSON, J.P., PESCI, E.C., IGLEWSKI, B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* e *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 5756-5767, 1997.

PEARSON, J.P., VAN DELDEN C., IGLEWSKI. Active efflux and diffusion are involved in transport in *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.1203-1210, 1999.

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 National Academy Science USA**, 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.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensm.-Wiss. u.-Technology**, v. 32, p. 321-326, 1999.

PRINGENT-COMBARET, C., BROMBACHER, E., VIDAL, O., AMBERT, A., LEJEUNE, P., LANDINI, P., DOREL, C. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p.7213-7223, 2001.

PRINGENT-COMBARET, C., PRENSIER, G., LE THI, T.T., VIDAL, O. LEJEUNE, P., DOREL, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. **Environmental Microbiology**, v. 2, p. 450-464, 2001.

PROUTY, A.M., SCHWESINGER, W.H., AND GUNN, J.S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2640–2649, 2002.

QURESHI, N., ANNOUS, B.A., EZEJI, T.C., KARCHER, P., MADDOX, I.S. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. **Microbial Cell Factories**, v.4, n.24, 2005. Disponível em: <<http://www.microbialcellfactories.com/content/4/1/24>>. Acesso em: 06/10/2006.

RAIVIO, T. L., SILHAVI, T. J. Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two component system. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 7720-7733, 1997.

RAVN, L., CHRISTENSEN, A.B., MOLIN, S., GIVSKOV, M., GRAM, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. **Journal of Microbiological Methods**, v.44, p.239-251, 2001.

RAWLINGS, D. E. Heavy metal mining using microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 65-91, 2002.

READING, N.C., SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 254, p. 1-11, 2006.

REDFIELD, R.J. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? **Trends in Microbiology**, v.10, p.365-370, 2002.

REISNER, A. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Molecular Microbiology**, v.48, p. 442-445, 2003.

REN, D., SIMS, J.J., WOOD, T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 731-736, 2001.

REN, D., BEDZYK, L.A., YE, R.W., THOMAS, S.M. and WOOD, T.K. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. **Biotechnology Bioengineering**, v 88, p. 630-642, 2004.

REVERCHON, S., CHANTEGREL, B., DESCHAYERS, C., DOUTHEAU, A., COTTE-PATTAT, N. New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists of antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. **Bioorganic Medical Chemical Letters**, v. 12, p. 1153-11576, 2002.

ROBERTS, A.P., PRATTEN, J., WILSON M., MULLANY, P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 636, 1999.

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.

ROMLING, U. BIAN, Z., HAMMAR, M., SIERRALTA, W.D., NORMARK, S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. **Journal of Bacteriology**, v.180, p. 722-731, 1998.

RONNER, A.B., WONG, A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

RUMJANEK, N.G., FONSECA, M.C.C., XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 35-50 2004.

SAKURAI, A., IMAI, H., TAKENAKA, Y., SAKAKIBARA, M. Simulation of citric acid production by rotating disk contactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n.6, p. 689-696, 1997.

SAUER, K., CAMPER, A.K., EHRLICH, G.D., COSTERTON, J.W., DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v.184, p. 1140–1154, 2002.

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.

SCHULTZ, M. P., SWAIN, G.W. The influence of biofilms on skin friction drag. **Biofouling**, v. 15, n. 1-3, p. 129-139, 2000.

SHAPIRO, J.A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual Review of Microbiology**, v.52, p.81-104, 1998.

SHEA, C. NUNLEY, J.W., WILLIANSO, J.C., SMITH-SOMMENVILLE, H.E. Comparisons of the adhesion properties of *Deleya marina* and the exopolysaccharide defective mutant strain DMR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p. 3107-3113, 1991.

SIMOES, M., PEREIRA, M.O., VIEIRA, M.J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 5, p. 217-223, 2003.

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.

SONG, B., LEFF, L.G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiological Research**, v. 161, p. 355-361, 2006.

SPERANDIO, V., MELLIES, J.L., NGUYEN, W., SHIN, S., KAPER, J.B. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 96, p. 15196–15201, 1999.

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.

SPERANDIO, V., TORRES, A. G., KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QscBC): a novel two component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 809-821, 2002.

SPERANDIO, V., TORRES, A.G., GIRÓN, J.A., KAPER, J.B. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5187-5197, 2001.

STANLEY, P.M. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.1493-1499, 1983.

STANLEY, N.R., BRITON, R.A., GROSSMAN, A.D., LAZAZZERA, B. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* using DNA microarrays. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 1951-1957, 2003.

STANLEY, N.R., LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.52, p.917-924, 2004.

STEINENBERG, R. E., HOLDEN, P. A. Macromolecular composition of unsaturated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source. **Biofilms**, v.1, p. 37-47, 2004.

STEWART, P. S. Diffusion in biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n.5, p. 1485-1491, 2003.

STICKLER, D. J., MORRIS, N. S., McLEAN, R. J, FUQUA, C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3486-3490, 1998.

STOODLEY, P., BEER, D.D., LEWANDOWSKI. Z. Liquid flow in biofilm systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p.2711-2716, 1994.

STOODLEY, P., J. D. BOYLE, D. De BEER AND H. M. Lappin-Scott. Evolving perspectives of biofilm structure. **Biofouling**, v. 14, n.1, p. 75-90, 1999.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

STOODLEY, P., WILSON, S., HALL-STOODLEY, L., BOYLE, J.D., LAPPIN-SCOTT, H.M., COSTERTON, J.W. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed species biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 5608–5613, 2001.

STROEHER, U.H., PATON, A.W., OGUNNIYI, A.D., PATON, J.C. Mutation of *luxS* of *Streptococcus pneumoniae* affects virulence in a mouse model. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3206–3212, 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.

SURETE, M.G., MILLER, M.B., BASSLER, B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 96, p. 1634-1644, 1999.

TEPLITSKI, M., ROBINSON, J. B., BAUER, W. D. Plants secrete substances that mimic bacterial N-Acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 13, p. 637-648, 2000.

TIJHUIS, L., HIJMAN, B., VANLOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. Influence of detachment, substrate loading and reactor scale on the formation of biofilms in airlift reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n.1-2, p. 7-17, 1996.

TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN, S. Spatial organization of microbial biofilm communities. **Microbial Ecology**, v. 40, p. 75-84, 2000.

UROZ, S., D'ANGELO-PICARD, C., CARLIER, A., ELASRI, M., SICOT, C., PETIT, A., OGER, P., FAURE, D., DESSAUX, Y. Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. **Microbiology**, v. 149, p.1981–1989, 2003.

Van LOOSDRECHT, M. C. M., EIKELBOOM, D, GJALTEMA, A., MULDER, A., TIJHUIS, L, HEIJNEN, J.J. Biofilm structures. **Water Science Technology**, v. 32, n. 8, p. 35-43, 1995.

VENTURI, V. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 1-9, 2003.

VIDAL, O. LONGIN, R., PRINGENT-COMBARET, C., DOREL, C., HOOREMAN, M., LEJEUNE, P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2442-2449, 1998.

WALKER, J. T., MACKERNESS, C.W., MALLON, D., MAKIN, T., WILLIETS, T., KEEVIL, C.W. Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water-system by chlorine dioxide. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, n. 4, p. 384-390, 1995.

WEBB, J. S. GIVSKOV, M., KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 578-585, 2003.

WHAN, L., DUNSTALL, G., ROWE, M.T. A study of the growth kinetics of two pseudomonads from pasteurized milk and the possible role of *quorum sensing*. **Milchwissenschaft**, v.55, p.371–373, 2000.

WHITEHEAD, N. A., BARNARD, A. M. L., SLATER, H., SIMPSON, N. J. L., SALMOND, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 365-404, 2001.

WHITELEY, M. BANGERA, M.G., BUMGARNER, R.E., PARSEK, M.R., TEITZEL, G.M., LORY, S., GREENBERG, E.P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 113, p. 860-864, 2001.

WINZER, K., YAO-HUI SUN, GREEN, A., DELORY, M, BLACKLEY, D., HARDIE, K.R., BALDWIN, T.J., TANG, C.M. Role of *Neisseria meningitidis luxS* in cell-to-cell signaling and bacteremic infection. **Infection and Immunity**, v.70, p. 2245–2248, 2002.

WIRTANEN, G., HUSMARK, U., MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, 1996.

XAVIER, J.B. PICIOREANU, C., ALMEIDA, J.S. VAN LOOSDRECHT, M.C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, 2005. Disponível em: <<http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf>>. Acesso em: 01/07/2005.

XU, F., BYUN, T., DEUSSEN, H.J., DUKE, K.R. Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 89-96, 2003.

YATES, E.A., PHILIPP, B., BUCKLEY, C., ATKINSON, S., CHHABRA S.R., SOCKETT, R.E., GOLDNER, M., DESSAUX, Y., CÁMARA, M., SMITH, H., WILLIAMS P. N-acylhomoserine lactone undergo lactonolysis in a pH-temperature, and acyl chain length –dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 70, n.10, p. 53-65-5646, 2002.

ZHANG, H.B., WANG, L.H., ZHANG, L.H. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of National Academy Science USA**, v. 99, p. 4638-4643, 2002.

ZHANG, H.B., WANG, C., ZHANG, L.H. The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p) ppGpp. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 1389-1401, 2004.

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.

ZHU, J., WINANS, S.C. The quorum sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 98, p. 1507-1512, 2001.

ZHU, J., MILLER, M.B., VANCE, R.E., DZIEJMAN, M, BASSLER, B.L., MEKALANOS, J.J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 99, p. 3129–3134, 2002.

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.

## CAPÍTULO 2

### FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas fluorescens* E DETECÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE QUORUM SENSING

#### 2.1. INTRODUÇÃO

A estocagem do leite cru, sob temperaturas de refrigeração, proporciona condições seletivas para as bactérias psicrotróficas, particularmente para as pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Essas bactérias são ubíquas na natureza, sendo que a contaminação dos produtos lácteos por esse grupo, geralmente, é decorrente do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências nos procedimentos de higienização na fonte de produção ou na indústria de laticínios (COUSIN, 1982; ENEROTH et al., 2000).

*Pseudomonas* spp., particularmente *P. fluorescens*, despertam preocupação em face de seu potencial deteriorador, por produzirem enzimas termoestáveis que podem comprometer a qualidade do leite e de seus derivados (LAW, 1979) e também por formarem biofilmes em diversas superfícies de contato (ALLISON et al., 1998; KJAERGAARD et al., 2000; SONG e LEFF, 2006).

Muitas bactérias Gram-negativas, incluindo membros do gênero *Pseudomonas*, regulam a expressão de alguns genes em resposta à densidade populacional por meio de N-acil-homoserinas lactonas em um mecanismo chamado *quorum sensing* (QS) (PEARSON et al., 1997; SHAW et al., 1997). O circuito do sistema QS em *P. aeruginosa* é relativamente bem compreendido. Entretanto, pouco

se conhece sobre esse mecanismo em outras espécies desse gênero (JUHAS et al., 2005). O sistema QS identificado em *Pseudomonas putida* IsoF, designado *ppu*, responsável por regular a formação de biofilmes nessa espécie, apresenta grau elevado de similaridade com o sistema *las* de *P. aeruginosa*, sendo que ambos os sistemas utilizam 3-oxo-C12-HSL como molécula sinal (STEIDLE et al., 2002). Por meio de cromatografia em camada fina e espectrometria de massa, Shaw et al. (1997) reportaram a existência de quatro moléculas diferentes de AHL em *P. fluorescens* 2-79, sendo N-(3-hidroxihexanoil)-L-HSL, N-(3-hidroxi-octanoil)-L-HSL, N-(3-hidroxi-decanoil)-L-HSL e N-octanoil-L-HSL. Outra AHL de *P. fluorescens* foi identificada como sendo N-hexanoil-HSL por Cha et al. (1998). Existem evidências de que *P. fluorescens* F113, uma estirpe utilizada como agente de biocontrole em beterraba, produz pelo menos três AHLs diferentes, a partir de uma nova sintase de AHL, Hdts, não-relacionada com os membros da família de proteínas LuxI, sendo N-(3-hidroxi-7-cistetradecanoil) homoserina lactona, N-decanoil homoserina lactona e N-hexanoil homoserina lactona (LAUE et al., 2000). A estirpe *P. fluorescens* NCIMB 10586, isolada do solo, possui os homólogos de LuxR/LuxI e MupI/MupR, que regulam a biossíntese do antibiótico mupirocina, mas a molécula sinalizadora não foi identificada (EL-SAYED et al., 2001). Outra estirpe que possui o sistema QS é *P. fluorescens* 2-79, produtora do antibiótico fenazina. O sistema é composto pelos genes *phzR* e *phzI*, que são homólogos da família *luxR-luxI* (KHAN et al., 2005). HOLDEN et al. (1999) identificaram em *P. fluorescens* um composto que ativou a luminescência em uma estirpe monitora; porém, este composto não era uma AHL, mas uma dicetopiperazina (DKP). DUNSTALL et al. (2005) avaliaram o efeito de nove AHLs sintéticas na duração da fase lag e na taxa de crescimento exponencial de *P. fluorescens* isoladas de leite. Verificaram que N-benzoiloxicarbonil-L-homoserina lactona e N-3-oxihexanoil-DL-homoserina lactona reduziram a duração da fase lag e aumentaram a taxa de crescimento das três estirpes avaliadas.

Um número expressivo de outras espécies do gênero *Pseudomonas* patogênicas de plantas, incluindo *P. savastanoi*, *P. tomato*, *P. helianthi* e *P. corrugata*, produzem moléculas de AHLs (DUMENYO et al., 1998; ELASRI et al., 2001). Entretanto, os genes requeridos para sua síntese e as funções reguladas por eles ainda não foram descritos, o que mostra a necessidade de estudos adicionais (JUHAS et al., 2005).

O QS desempenha função na regulação da arquitetura dos biofilmes. Mutações no gene da sintase de AHL *lasI* de *P. aeruginosa*, responsável pela síntese de 3-oxo-C12-HSL, afetou significativamente o desenvolvimento de biofilme. As bactérias mutantes *lasI* formaram biofilmes mais finos e planos, não-diferenciados e com pouca aderência ao substrato em relação à estirpe selvagem (DAVIES et al., 1998). Descobertas similares foram reportadas em estudos com *Burkholderia cepacia* (HUBER et al., 2001) e *Aeromonas hydrophila* (LYNCH et al., 2002).

As condições nutricionais também interferem na formação dos biofilmes. Christensen et al. (2002) demonstraram que a arquitetura do biofilme formado por *P. putida* R1 e *Acinetobacter* C6 foi dependente do substrato. Também tem sido evidenciado que o QS atua no controle da formação do biofilme por *Burkholderia cepacia* de modo dependente dos nutrientes do meio (CONWAY et al., 2002) e por *P. aeruginosa* (De KIEVIT et al., 2001; HEYDORN et al., 2002). Assim, as evidências demonstram que a regulação dos biofilmes é um processo multifatorial, incluindo uma combinação de componentes nutricionais e de reguladores como o QS (RICE e KOH, 2005).

Este estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo na formação de biofilmes e na atividade proteolítica de *P. fluorescens*, bem como o envolvimento do sistema *quorum sensing* na formação dessas estruturas.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e de Patógenos Alimentares do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa-MG.

### 2.2.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo

A formação de biofilmes foi avaliada em 11 estirpes de *P. fluorescens* (07A, 07B, 033, 041, 077, 097, 0109, 0123, 0126, 0137 e 0141) isoladas de leite cru refrigerado (PINTO, 2004) e em uma estirpe de referência *P. fluorescens* ATCC 13525. O estoque das culturas foi feito em Infusão de Cérebro e Coração (BHI) contendo 40 % de glicerol e congelado a  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Antes de cada experimento, as células foram reativadas por duas semeaduras consecutivas em caldo BHI com incubação a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 h.

As estirpes monitoras utilizadas para detecção de AHL estão listadas na Tabela 1. Estas estirpes foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) (peptona  $10\text{ g L}^{-1}$ , extrato de levedura  $5\text{ g L}^{-1}$ , NaCl  $5\text{ g L}^{-1}$ ) e, quando necessário, suplementadas com os antibióticos apropriados: tetraciclina a  $4,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  e espectinomicina a  $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cultivo de *A. tumefaciens* A136, kanamicina a  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cultivo de *C. violaceum* CV026 e tetraciclina a  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cultivo de *E. coli* pSB403. As estirpes monitoras *A. tumefaciens*

KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384) e WCF47(pCF218)(pCF372) foram cultivadas em meio mínimo AT. O meio AT foi adicionado dos antibióticos tetraciclina na concentração de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , espectinomicina a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , gentamicina a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cultivo da estirpe KYC55 e dos antibióticos tetraciclina a 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e kanamicina a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cultivo da estirpe WCF47. A estirpe *P. aeruginosa* PAO-R1 (pTS400) foi cultivada em PTSB (peptona 50  $\text{g L}^{-1}$ , TSB 2,5  $\text{g L}^{-1}$ ).

Tabela 1 – Características das estirpes usadas como monitoras de *quorum sensing*

Estirpe	Plasmídeo sensor	Sistema QS	Sistema repórter	Responde melhor a	AHLs detectadas	Referência
<i>C. violaceum</i> CV026	-	CvI/R ( <i>C. violaceum</i> )	Pigmento violaceína	C6-AHL	C6-3oxo-HSL C8-HSL C4-HSL	Mc Clean et al., 1997
<i>E. coli</i>	pSB403	LuxI/R ( <i>V. fischeri</i> )	<i>luxCDABE</i> (luminescência)	C6-3oxo-HSL	C6-HSL C8-3oxo-HSL C8-HSL	Winson et al., 1998
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136	pCF218 pCF372	+ TraI/R ( <i>A. tumefaciens</i> )	$\beta$ -galactosidase	C8-3oxo-HSL	C8-3oxo-HSL	Fuqua e Winans, 1996
<i>A. tumefaciens</i> WCF47	pCF218 pCF372	+ TraI/R ( <i>A. tumefaciens</i> )	$\beta$ -galactosidase	C8-3oxo-HSL	Todas oxo AHLs C6-HSL C8-HSL C10-HSL C12-HSL C14-HSL C6-3-hidroxi-HSL C8-3-hidroxi-HSL C10-3-hidroxi-HSL	Zhu et al., 1998
<i>A. tumefaciens</i> KYC55	pJZ384+pJZ410 +pJZ372	TraI/R ( <i>A. tumefaciens</i> )	$\beta$ -galactosidase	C8-3oxo-HSL	Todas oxo AHLs C6-HSL C8-HSL C10-HSL C12-HSL C14-HSL C6-3-hidroxi-HSL C8-3-hidroxi-HSL C10-3-hidroxi-HSL	Zhu et al., 2003
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44 (mutante <i>swrI</i> )	-	SwrI/R ( <i>S. liquefaciens</i> MG1)	Motilidade por espalhamento ( <i>swarming</i> )	Butiril-HSL (C4HSL)	C4-HSL C6-HSL	Eberl et al. 1996
<i>P. aeruginosa</i> PAO-R1	pTS400	mutante <i>lasR</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	$\beta$ -galactosidase	PQS	PQS	Pesci et al. 1999

### 2.2.2. Ensaio de formação do biofilme em diferentes meios de cultura

As 11 estirpes de *P. fluorescens* e a estirpe de referência ATCC 13525 foram cultivadas por aproximadamente 18 h a 26 °C, sob agitação, em 10 mL de caldo BHI e, em seguida, centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf 5415C, Hamburgo, Alemanha) a 4.300 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1,5 mL de solução salina 0,85 %, seguindo-se nova centrifugação na mesma velocidade e tempo. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e a densidade óptica das células foi padronizada de forma a se obter uma população equivalente a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Aliquotas de 20 µL dessa suspensão foram inoculadas em 180 µL de meio LB contido em microplacas de poliestireno de 96 poços. A incubação foi a 26 °C, por 24, 48 e 72 h. Nestes períodos de incubação, a densidade óptica das células foi determinada a 600 nm e o meio de cultura contendo células não-aderidas foi removido, batendo-se a microplaca invertida, levemente, sobre papel absorvente. As células aderidas às microplacas foram coradas por 30 min com 200 µL de cristal violeta a 0,1 % (p/v) em água. Em seguida, removeu-se o corante e os pocinhos foram lavados delicadamente, por três vezes consecutivas, com 200 µL de água destilada. As placas foram secadas em estufa a 40 °C, por 15 min. O cristal violeta retido em cada pocinho foi dissolvido em 200 µL de etanol (95 %) e a absorvância (A) medida a 600 nm em Leitor de Elisa VERSA MAX (Molecular Devices, Califórnia, EUA) (CONWAY et al., 2002).

O procedimento foi realizado ainda substituindo-se o meio LB pelo ABT ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g L<sup>-1</sup>; NaCl 0,3 g L<sup>-1</sup>; MgCl<sub>2</sub> 1 mM L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub> 0,01 mM L<sup>-1</sup>; tiamina 2,5 mg L<sup>-1</sup>; glicose 5 g L<sup>-1</sup>; casaminoácidos 5 g L<sup>-1</sup>) (CLARK e MAALOE, 1967), Meio Mínimo de Sais – MMS (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g L<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>; glicerol 4 g L<sup>-1</sup> e CaCl<sub>2</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>) e caldo TYEP (triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2,5 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>) adicionado de 0,25 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.

O experimento foi conduzido, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo que as médias de duas repetições foram oriundas de oito réplicas. Para a realização das análises estatísticas, empregou-se o sistema GENES, versão

Windows 2006 (CRUZ, 2006a e b). Os dados foram analisados por meio da análise de variância, considerando o esquema fatorial 3 x 5 x 12, correspondente a três tempos, cinco meios e doze estirpes. A comparação das médias foi realizada pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

### **2.2.3. Atividade proteolítica das células sésseis e planctônicas**

O isolado de *P. fluorescens* 097 foi cultivado em microplacas contendo caldo ABT, LB, MMS e TYEP adicionado de 0,25 % de CaCl<sub>2</sub>, como descrito previamente no item 2.2. Nos tempos 0, 4, 8, 12, 16, 24 e 48 h retirou-se uma alíquota da cultura, que foi diluída para quantificação do número de células pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) em ágar Padrão para Contagem (PCA). Outra alíquota foi retirada para determinação da atividade proteolítica, segundo Ewings et al. (1984), utilizando-se a azocaseína como substrato. Os valores de absorvância, obtidos em espectrofotômetro (BECKMAN DU640, EUA) com comprimento de onda de 366 nm, foram transformados em unidades de atividade enzimática, considerando-se que uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de promover aumento de 0,01 no valor de absorvância por hora de incubação.

### **2.2.4. Detecção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing***

#### **2.2.4.1. Homoserinas lactonas aciladas (autoindutor-1)**

A produção de AHL por estirpes de *P. fluorescens* isoladas de leite cru refrigerado e pela estirpe ATCC 13525 foi avaliada em bioensaio realizado em meio sólido descrito por RAVN et al. (2001), utilizando as estirpes monitoras *C. violaceum* CV026 ou *E. coli* pSB403. As estirpes avaliadas foram ativadas em caldo LB, a 26 °C, por aproximadamente 18 h e, então, foram estriadas em ágar LB, em paralelo à estirpe monitora. A estirpe *C. violaceum* CV026 é um mutante deficiente na produção de AHL e violaceína, um pigmento cuja produção é regulada pelo sistema *quorum sensing*. Porém, na presença de AHL exógena de cadeias

laterais de quatro a oito carbonos, a cultura torna-se roxa, com graus diferentes de sensibilidade. Portanto, resultado positivo foi considerado quando foi observada a produção do pigmento violaceína pela estirpe *C. violaceum* CV026. *E. coli* pSB403 é uma estirpe transformante que produz luminescência na presença de AHLs exógenas de cadeias laterais de seis a oito carbonos com ou sem substituintes oxo.

O controle negativo deste experimento foi realizado estriando as estirpes monitoras paralelas a si mesmas. Como controle positivo para a produção de AHL nos bioensaios com *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403, foi utilizada a estirpe *C. violaceum* ATCC 6357, produtora de AHL de seis carbonos.

A presença de cadeias longas de AHLs foi detectada em ensaio de inibição da produção de violaceína em meio suplementado com N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL). AHLs com cadeias laterais entre 10 a 14 carbonos não induzem a produção de violaceína por *C. violaceum* CV026. Entretanto, em presença de AHLs ativadoras desse pigmento, as AHLs de cadeia longa podem ser detectadas, dada a sua capacidade de inibir a produção do mesmo (MCCLEAN et al., 1997). Portanto, a estirpe a ser testada foi estriada em LB suplementado com 75 nM de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL). As placas foram incubadas por 24 h a 26 °C e, logo após este período de incubação, a estirpe monitora *C. violaceum* CV026 foi estriada em paralelo à estirpe-teste. Após reincubação a 26 °C por mais 24 h, a ausência de pigmentação de *C. violaceum* CV026, em razão da inibição da produção de violaceína, foi considerada um indicativo da produção de AHL de cadeia longa pela cultura avaliada. Como controle negativo, foi utilizada a própria estirpe monitora e, como controle positivo, a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 15442, que produz AHL de quatro e 12 carbonos.

Realizou-se também um ensaio de detecção de AHL, utilizando-se como monitora *S. liquefaciens* MG44, mutante incapaz de apresentar motilidade em ausência de AHL exógena. A estirpe repórter foi inoculada pontualmente em placas de meio ABT contendo 0,7 % de ágar (p/v), 0,5 % (p/v) de casaminoácidos e 10 % (v/v) do sobrenadante das culturas de *P. fluorescens* (Van HOUTT et al., 2004). Considerou-se como resultado positivo do experimento a indução de motilidade em *S. liquefaciens* MG44, evidenciado pelo espalhamento das colônias na superfície do meio. *S. liquefaciens* MG44 e a estirpe selvagem MG1 foram inoculadas nas placas sem o sobrenadante livre de células e serviram como controles negativo e positivo, respectivamente.

Os isolados de *P. fluorescens* foram também avaliados quanto à produção de AHL em meio líquido AT, conforme formulação de Tempé et al. (1977), em um bioensaio com as estirpes monitoras *A. tumefaciens* A136, *A. tumefaciens* WCF47 e *A. tumefaciens* KYC55, segundo Pinto (2005). As estirpes de *P. fluorescens* foram pré-ativadas em meio AT por 24 h, a 25 °C, sob agitação de 150 R.P.M. Em seguida, foram inoculadas em 50 mL de meio AT e incubadas sob as mesmas condições. Foi obtido o sobrenadante livre de células (SLC) por centrifugação a 6.000 g, por 10 min, a 4 °C, em centrífuga Sorvall RC5C (Dupont, EUA). O sobrenadante foi esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro (Schleicher & Schuell, Brasil) e estocado a -20 °C até o momento do ensaio. Aproximadamente 12 mL do sobrenadante, pré-aquecido a 40 °C, foram misturados com 5 mL do ágar AT adicionado de 40 µg mL<sup>-1</sup> de X-gal e os antibióticos apropriados para as culturas *A. tumefaciens* A136, KYC55 e WCF47. Em seguida, a mistura foi vertida em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, na temperatura de 50 °C. Após a solidificação do meio, as estirpes monitoras foram estriadas e o surgimento da coloração azul foi monitorado periodicamente, por até 72 h de incubação a 25 °C. Foi também preparado ágar AT suplementado com 75 nM de HHL como controle positivo e ágar AT sem suplementos foi utilizado como controle negativo. A presença de AHL no sobrenadante esterilizado da cultura foi indicada pela produção de coloração azul, resultante da hidrólise de X-gal pela estirpe monitora.

Cada bioensaio descrito foi realizado em duplicata e em duas repetições independentes.

#### **2.2.4.2. 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS)**

As 12 estirpes de *P. fluorescens* foram ativadas por 18 h em 10 mL de caldo BHI e centrifugadas a 4.300 g por 10 min em microcentrífuga Sorvall, modelo MC12V (Dupont, EUA). Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em membranas de 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro (Schleicher & Schuell, Brasil) e mantidos em tubos esterilizados, sob refrigeração, até o momento do uso. A estirpe monitora *P. aeruginosa* PAO-R1 (pTS400) foi cultivada por aproximadamente 18 h, a 37 °C, em meio PTSB (Pesci et al., 1999) e diluída no mesmo meio até atingir densidade óptica

igual a 0,05. Um volume de 2 mL dessa suspensão foi adicionado a 2 mL do extrato livre de células de *P. fluorescens*. Os tubos foram incubados, por 18 h, a 37 °C. Para determinar a produção da enzima repórter  $\beta$ -galactosidase, centrifugou-se a estirpe monitora previamente incubada a 4.300 g por 10 min em microcentrífuga Sorvall, modelo MC12V (Dupont, EUA). As células obtidas foram ressuspensas em 2 mL de tampão tris-HCl (100 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,8) e a densidade óptica foi padronizada entre 0,3 e 1,0 a 600 nm. Em seguida, adicionaram-se 500  $\mu$ L de reagente de permeabilização (100 mmol L<sup>-1</sup> de tris-HCl, pH 7,8; 32 mmol de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA; 4% de Triton X-100, 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de sulfato de polimixina B), 500  $\mu$ L de ONPG (10 mg mL<sup>-1</sup> em água) e mediu-se a densidade óptica de um em um minuto, até 30 min. Como controle negativo, utilizou-se meio de cultura PTSB e, como controle positivo, o sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1.

#### **2.2.5. Efeito da adição de homoserinas lactonas aciladas sintéticas no crescimento e na formação de biofilme**

O efeito de AHLs sintéticas no crescimento e na formação do biofilme de *P. fluorescens* 097 foi avaliada pelo ensaio em microplacas, utilizando-se o MMS. A estirpe *P. fluorescens* 097 foi cultivada por, aproximadamente, 18 h a 26 °C, sob agitação, em 10 mL de caldo BHI e, em seguida, centrifugada em microcentrífuga Sorvall (modelo MC12V, Dupont, EUA) a 4.300 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado ressuspensado em 1,5 mL de solução salina 0,85 % e novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e a densidade óptica das células foi padronizada de forma a se obter uma população equivalente a 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Um volume de 20  $\mu$ L dessa suspensão foi adicionado em 180  $\mu$ L de MMS contido em microplacas de poliestireno de 96 poços e acrescido de 25 a 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona hidrobrometo (ABL) e de concentrações de 25 a 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL).

A microplaca foi incubada a 26 °C, sem agitação, por até 48 h. A densidade óptica foi determinada a 600 nm nos tempos 8, 24 e 48 h. Após essas etapas, o fluido da cultura contendo células não-aderidas foi removido e as etapas subsequentes

foram realizadas como descrito no item 2.2. Os resultados obtidos foram comparados com a capacidade de formar biofilme na ausência das AHLs.

Esse experimento foi realizado em oito réplicas.

#### **2.2.6. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável**

Foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304, acabamento # 4, nas dimensões de 2 x 6,0 x 0,1 cm, com 24 cm<sup>2</sup> de área, perfurados em um dos vértices. Para manter os cupons suspensos e imersos no meio de cultura líquido, foram utilizados fios de níquel-cromo tipo duro elástico de 0,50 mm (Morelli, Brasil). Em uma das extremidades de cada fio, foi emoldurado um gancho adequado à sua fixação na boca do frasco Erlenmeyer e, na outra extremidade, para conter o cupom. Para limpeza e esterilização, os cupons e os fios foram tratados segundo procedimentos de Andrade et al. (1998), com modificações. Os cupons foram submetidos à escovação com detergente líquido e enxaguados em água destilada. Resíduos de gorduras foram retirados pela imersão em acetona durante 30 min. A seguir, foram imersos em solução de NaOH 1 % durante 1 hora e enxaguados várias vezes com água destilada (PINTO, 2004). Após secagem ao ar, cada cupom foi preso na extremidade do fio, embrulhado em papel Kraft e esterilizado a 121 °C, durante 15 min, em autoclave.

Frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 280 mL de caldo MMS foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min. Os meios de cultivo foram inoculados com uma alíquota de 2,8 mL das estirpes 097 e 0109 de *P. fluorescens* previamente ativadas em BHI, centrifugadas e ressuspendidas em solução salina estéril 0,85% e padronizadas em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron Corporation, Madison WI, EUA) a 600 nm para uma densidade óptica igual a 0,45, equivalente a, aproximadamente, 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Após inoculação e homogeneização, foram introduzidos nos Erlenmeyers 14 cupons de aço inoxidável. Durante a incubação a 26 °C, dois cupons foram retirados após a inoculação e transferidos para tubo de ensaio contendo 20 mL de solução salina esterilizada, para enxágüe. Um deles foi usado para a quantificação de células aderidas em tempo zero e o segundo cupom foi tratado para observação em microscópio de epifluorescência.

A cada 24 h, os cupons foram assepticamente removidos, lavados em 280 mL de solução salina esterilizada e transferidos para um novo frasco contendo 280 mL de meio previamente inoculado como descrito acima, segundo metodologia descrita por Joseph et al. (2001). A cada período de tempo definido (0, 16, 24, 40, 48, 72, 96 e 120 h), um cupom foi transferido para tubo de ensaio com 20 mL de solução salina, para posterior quantificação de células sésseis, e outro retirado para observação em microscopia de epifluorescência.

#### **2.2.6.1. Quantificação das células sésseis**

Para quantificação das células aderidas, os cupons foram retirados dos frascos de cultura nos diferentes tempos e lavados em solução salina esterilizada, para retirada de células não-aderidas. A seguir, foram mergulhados em 20 mL de salina esterilizada contida em tubos de ensaio e submetidos à ação de ultra-som (Ultrasonic Cleaners – Model 1510), durante 30 min, para remoção das células aderidas. Essa suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos e uma alíquota foi retirada para realizar diluições decimais para serem plaqueadas pela técnica de microgotas em PCA. Após incubação por 18 a 24 h a 26 °C, as contagens foram feitas em lupa (Olympus – SZ40). Essa mesma suspensão de células foi submetida à centrifugação a 5.000 g em centrífuga Sorvall RC5 (Dupont, EUA) por 10 min, para obtenção do sobrenadante livre de células (SLC) que foi utilizado para a determinação da atividade proteolítica.

#### **2.2.6.2. Observação dos biofilmes por microscopia de epifluorescência**

Os cupons foram removidos dos meios de cultivo nos tempos 0, 16, 24, 40, 48 72, 96 e 120 h, enxaguados com solução fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  68 g L<sup>-1</sup>, pH 7,2) e afixados em lâminas de microscopia com fita adesiva dupla-face. Foram recobertos com solução Kirkpatrick (álcool isopropílico, clorofórmio e formaldeído, 6:3:1) durante 10 min, para fixação das bactérias. A seguir, foram recobertos com alaranjado de acridina a 0,04 % em água, durante 5 min (PARIZZI, 1999). O excesso de corante foi retirado com enxágüe brando com solução fosfato de potássio.

Procedeu-se ao exame dos cupons corados em microscópio de epifluorescência, modelo PX60 (Olympus, Japão), em aumento de 200 e 1.000 vezes e com os filtros WB e WG.

### **2.2.6.3. Determinação da atividade proteolítica das células sésseis**

A atividade proteolítica foi avaliada no sobrenadante obtido a partir dos cupons (SLC), conforme descrito no item 2.6.1 nos tempos 0, 16, 24, 40, 48, 72 e 96 h. Esta atividade foi determinada segundo metodologia de EWINGS et al. (1984), utilizando-se azocaseína a 0,5 % como substrato, conforme descrito no item 2.3.

### **2.2.7. Detecção de moléculas sinalizadoras nos biofilmes**

Biofilmes de *P. fluorescens* 097 foram obtidos em cupons de aço inoxidável cultivando-se as células em MMS, conforme descrito no item 2.6, modificando-se o inóculo inicial para densidade óptica maior que 1.0, para garantir maior produção de moléculas sinalizadoras. Após 24 e 48 h de incubação, dois cupons foram removidos, lavados em 20 mL de solução salina a 0,85 % esterilizada, colocados em placas de Petri esterilizadas e cada lado do cupom foi exposto à luz ultravioleta (312 nm, 52 cm de distância) por 30 min, a fim de inativar as células do biofilme sem destruir as moléculas sinalizadoras. Para realizar o ensaio de indução da enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal), os cupons foram transferidos para outra placa de Petri e recobertos com 5 mL de ágar AT 0,75 %, a 42 °C, previamente inoculado com, aproximadamente,  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> da estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47. Para esse ensaio, o ágar AT foi suplementado com 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de X-gal e com os antibióticos apropriados. No ensaio de inibição da produção do pigmento violaceína, os cupons foram recobertos com 5 mL de ágar LB 0,75 % previamente inoculado com, aproximadamente,  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> da estirpe monitora *C. violaceum* CV026, suplementado com 75 nmol L<sup>-1</sup> de HHL e com os antibióticos apropriados, conforme item 2.1. As placas foram incubadas a 30 °C e os resultados foram observados por até 48 h. Os mesmos ensaios foram realizados com cupons não submetidos ao tratamento ultravioleta. Imergiu-se um cupom contendo biofilme que foi exposto à

luz UV em meio de cultura e incubou-se a 26 °C, a fim de avaliar o efeito desse tratamento sobre a viabilidade das células. Como controle negativo do experimento, foram utilizados cupons esterilizados sem formação de biofilme. Como controle positivo para o ensaio de indução da  $\beta$ -gal, utilizou-se ágar AT adicionado de 75 nM de HHL e, para o controle positivo do ensaio de inibição da produção de pigmento por *C. violaceum* CV026, suplementou-se o ágar com 75 nM de HHL e 75 nM N-dodecanoil-DL-homoserina lactona (C12-HSL). A presença de AHL de cadeias longas no biofilme foi indicada pela produção de coloração azul por *A. tumefaciens* WCF47, resultante da hidrólise de X-gal pela estirpe monitora ou pela inibição de violaceína por *C. violaceum* CV026. Cada bioensaio foi realizado em duas repetições independentes.

#### **2.2.8. Detecção de homoserinas lactonas aciladas nos extratos de células planctônicas e sésseis**

Biofilmes de *P. fluorescens* 097 foram formados em 15 cupons de aço inoxidável por 24 h e por 48 h em MMS, conforme descrito no item 2.6. Em cada tempo, tomaram-se 280 mL de MMS contendo células planctônicas, que foram centrifugados a 13.000 g, por 30 min, em centrífuga refrigerada Sorvall (RC5S, Dupont, EUA) para posterior extração das AHLs com acetato de etila (RAVN et al., 2001). Para obtenção dos extratos das células sésseis em cada tempo, os cupons foram removidos do meio de cultivo, lavados em 280 mL de solução salina a 0,85 % e imersos em frascos Erlenmeyer contendo 150 mL de solução salina a 0,85 %. Esses frascos foram colocados em ultra-som (Ultrasonic Cleaners – modelo 1510), por 30 min para remoção das células aderidas aos cupons. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 13.000 g por 30 min em centrífuga Sorvall (RC5S, Dupont, EUA).

A extração de AHL foi feita no SLC das células sésseis e planctônicas adicionando-se volume equivalente de acetato de etila acidificado com 0,5% de ácido fórmico (v/v). As misturas (280:280 mL ou 150:150 mL) foram agitadas vigorosamente por 30 segundos, em funil de separação, por três vezes para permitir a separação das fases entre os períodos de agitação. As frações contidas na parte inferior do funil foram removidas e mantidas em béquer para que fossem adicionadas de igual volume de acetato de etila. O procedimento de extração foi realizado por

duas vezes (SHAW et al., 1997). Após a evaporação completa do extrato em evaporador rotativo (modelo MA 120, Marconi, Brasil), o mesmo foi ressuspenso em 600  $\mu\text{L}$  de água destilada esterilizada adicionada de 0,05 % de Tween 80. Os extratos foram transferidos para frascos de penicilina e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. O mesmo procedimento de extração foi usado em 150 mL de MMS, para ser usado como controle negativo dos experimentos subsequentes.

A presença de AHLs de cadeias longas no extrato foi verificada no ensaio de inibição da produção de pigmento violaceína pela estirpe *C. violaceum* CV026. Alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  do extrato foram adicionadas a pocinhos de 3 mm de diâmetro feitos em ágar LB 1,2 %, previamente inoculado com, aproximadamente,  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  da estirpe monitora *C. violaceum* CV026 e adicionado dos antibióticos apropriados e de 75  $\text{nmol L}^{-1}$  de HHL. A formação de halo despigmentado turvo ao redor do poço foi considerada como resultado positivo para a presença de AHL de cadeia longa.

Realizou-se também o ensaio de indução da  $\beta$ -gal com a estirpe *A. tumefaciens* WCF47. Para esse ensaio, um volume de 25  $\mu\text{L}$  dos extratos foi colocado em pocinhos de 3 mm de diâmetro feitos em ágar AT 0,9 %, previamente inoculado com, aproximadamente,  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  da estirpe *A. tumefaciens* WCF47, suplementado com 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de X-gal e com os antibióticos apropriados. Considerou-se como resultado positivo a formação de halo azul ao redor do poço, resultante da hidrólise de X-gal. Como controle positivo do ensaio, foram utilizados 25  $\mu\text{L}$  de HHL a 75  $\text{nmol L}^{-1}$  e, como controle negativo, 25  $\mu\text{L}$  de extrato de MMS.

Cada bioensaio foi realizado em duas repetições independentes.

### **2.2.9. Caracterização das homoserinas lactonas aciladas**

Foram utilizados como padrões  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona hidrobrometo, N-hexanoil homoserina lactona, N-decanoil-DL-homoserina lactona, N-dodecanoil-DL-homoserina lactona e N-tetradecanoil-DL-homoserina lactona (Fluka, Suíça). Os padrões e as amostras foram aplicados em placas de cromatografia em camada delgada de fase reversa (CCD) ( $\text{C}_{18}$ , RP 254s, Merck, Alemanha), medindo 20 x 20 cm, em volumes de 10 a 20  $\mu\text{L}$ . Os cromatogramas foram desenvolvidos no sistema

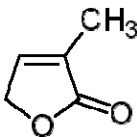
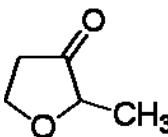
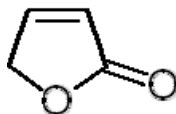
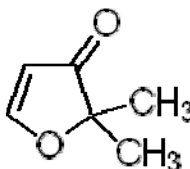
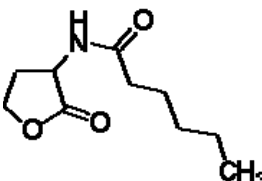
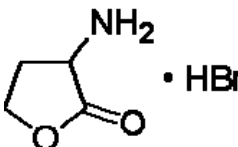
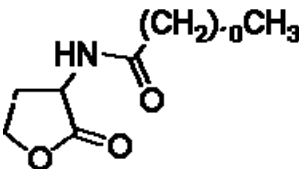
de solvente metanol/água (60:40, vol/vol). Depois do desenvolvimento, o solvente foi evaporado e as placas secas foram recobertas com a cultura da bactéria preparada como segue. Trinta mL da cultura de *A. tumefaciens* estirpe A136 ativada por 24 h foi usada para inocular 150 mL de ágar LB 0,75 %, previamente suplementado com 50 µg mL<sup>-1</sup> de X-gal, 100 µg mL<sup>-1</sup> de kanamicina e 20 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina. O volume total de 180 mL da cultura foi mantido a 43 °C. Após homogeneização, a cultura foi espalhada uniformemente sobre a superfície da placa emoldurada com uma proteção de fita crepe para impedir o derramamento do ágar. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 30 °C por 16 a 24 h, em um recipiente plástico umidificado, devidamente fechado (RAVN et al., 2001). Nesse ensaio, o surgimento de manchas de coloração azul nas placas foi considerado como resultado positivo para a presença de AHLs (SHAW et al., 1997). Os fatores de retardamento (*Rf*) das amostras e dos padrões foram obtidos, dividindo-se a distância percorrida pela mancha (centro) pela distância percorrida pelo solvente.

#### **2.2.10. Efeito da adição de ativadores e de inibidores de *quorum sensing* na formação de biofilme**

Para estudar o efeito de homoserinas lactonas aciladas e de furanonas sintéticas no crescimento e na formação de biofilme de *P. fluorescens* 097, realizou-se o mesmo procedimento descrito no item 2.2, com modificações, utilizando-se o meio MMS. A estirpe foi cultivada por, aproximadamente, 18 h, a 26 °C, sob agitação, em 10 mL de caldo BHI e, em seguida, centrifugada em microcentrífuga (Eppendorf 5415C, Hamburgo, Alemanha) a 4.300 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado ressuspendido em 1,5 mL de MMS e novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e a densidade óptica das células foi padronizada entre 0,4 e 0,5, de forma a se obter uma população equivalente a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Colocaram-se 20 µL dessa suspensão em 180 µL de MMS contidos em microplacas de poliestireno de 96 poços acrescidos das furanonas sintéticas (Aldrich, Alemanha) 3-metil-2(5H) furanona, 2-metiltetrahydro-3-furanona, 2(5H)-furanona e 2,2-dimetil-3(2H)furanona, de forma a manter as concentrações finais de 0,01, 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup>. As AHLs sintéticas (Fluka, Suíça) α-amino-γ-butirolactona hidrobrometo, N-hexanoil-DL-

homoserina lactona, N-decanoil-DL-homoserina lactona e N-dodecanoil-DL-homoserina lactona também foram adicionadas, nas concentrações finais de 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As estruturas químicas das furanonas e das AHLs que foram utilizadas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Estruturas químicas e fórmulas moleculares das AHLs e das furanonas utilizadas. (1) 3-metil-2(5H) furanona (MF), (2) 2-metiltetrahidro furan-3-ona (MTHF), (3) 2(5H)-furanona (F), (4) 2,2-dimetil-3(2H)-furanona (DMF) (5) N-hexanoil-DL-homoserina-lactona (HHL), (6)  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona hidrobrometo (ABL) e (7) N-dodecanoil-DL-homoserina lactona (DDHL)

(1) MF	(2) MTHF	(3) F
		
$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2$
(4) DMF	(5) HHL	(6) ABL
		
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3$	$\cdot \text{HBr}$
	(7) DDHL	
		
	$\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_3$	

Fonte: Sigma-Aldrich. Disponível em: [http://: www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com).

Embora os tratamentos tenham efeito de doses, o fato de se ter apenas três concentrações de furanonas não permitiria um ajuste ideal dos dados (Cruz\*, comunicação pessoal), uma vez que três pontos é a quantidade mínima para se traçar uma reta. Dessa forma, os dados referentes ao efeito da adição de ativadores e inibidores de *quorum sensing*, no crescimento e na formação de biofilmes, advindos de delineamento inteiramente casualizado, foram analisados por meio da análise de variância. As médias dos tratamentos, advindas de duas repetições com oito réplicas cada, foram analisadas por meio do teste de Dunnett, a 5 % de probabilidade. Este teste teve por finalidade comparar médias de cada tratamento com uma ou mais testemunhas (controle). A diferença significativa entre a média de um tratamento e de uma testemunha foi avaliada, tendo como referência a diferença mínima significativa. Empregou-se, para as análises estatísticas, o sistema de análises GENES, versão Windows 2006 (CRUZ, 2006a e b).

---

\* - Cosme Damião Cruz, Professor Titular da UFV.

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Formação de biofilme em diferentes meios de cultivo

Após 24, 48 e 72 h de incubação, observou-se maior crescimento ( $P<0,05$ ) das estirpes de *P. fluorescens* nos meios complexos LB, TYEP e em TYEP adicionado de 0,25 % de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 1). As maiores densidades ópticas obtidas nesses meios são justificadas, por se tratar de meios nutricionalmente ricos, que contêm compostos como triptona, peptona e extrato de levedura. Os meios ABT e MMS são meios pobres e quimicamente definidos, sendo menos favoráveis ao crescimento microbiano.

Todas as estirpes avaliadas apresentaram capacidade de se aderirem em poliestireno com afinidades diferenciadas (Figura 2). Após 24 e 48 h de incubação, verificou-se que, quanto maior o crescimento (Figura 1), maior a quantidade de células aderidas (Figura 2). Dentre as 12 estirpes avaliadas, *P. fluorescens* 097, 0109, 0137 e 0141 destacaram-se por apresentar maior capacidade de formar biofilmes ( $P<0,05$ ), independente do meio de cultivo e do tempo de incubação (Figura 2). Maior potencial de adesão da estirpe *P. fluorescens* 097 em aço inoxidável, comparativamente a uma mistura de sete outras estirpes de *P. fluorescens* isoladas de leite, também foi constatado por Machado (2006).

Calculando-se a razão entre a absorvância do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais, verificou-se que o MMS foi o mais favorável ( $P<0,05$ ) à formação dos biofilmes (Figura 3).

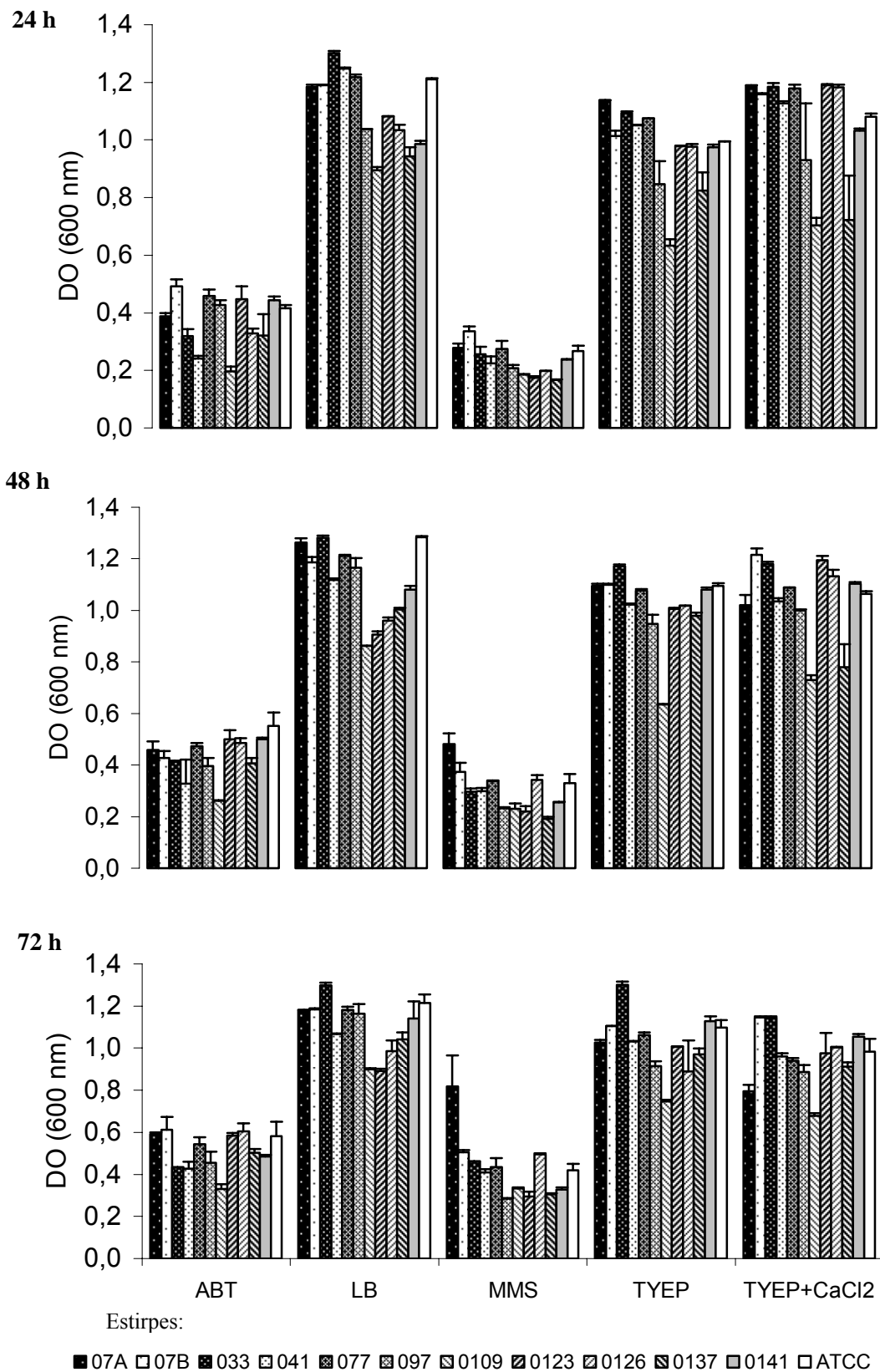


Figura 1 – Densidade óptica de culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após incubação a 26 °C por 24, 48 e 72 h.

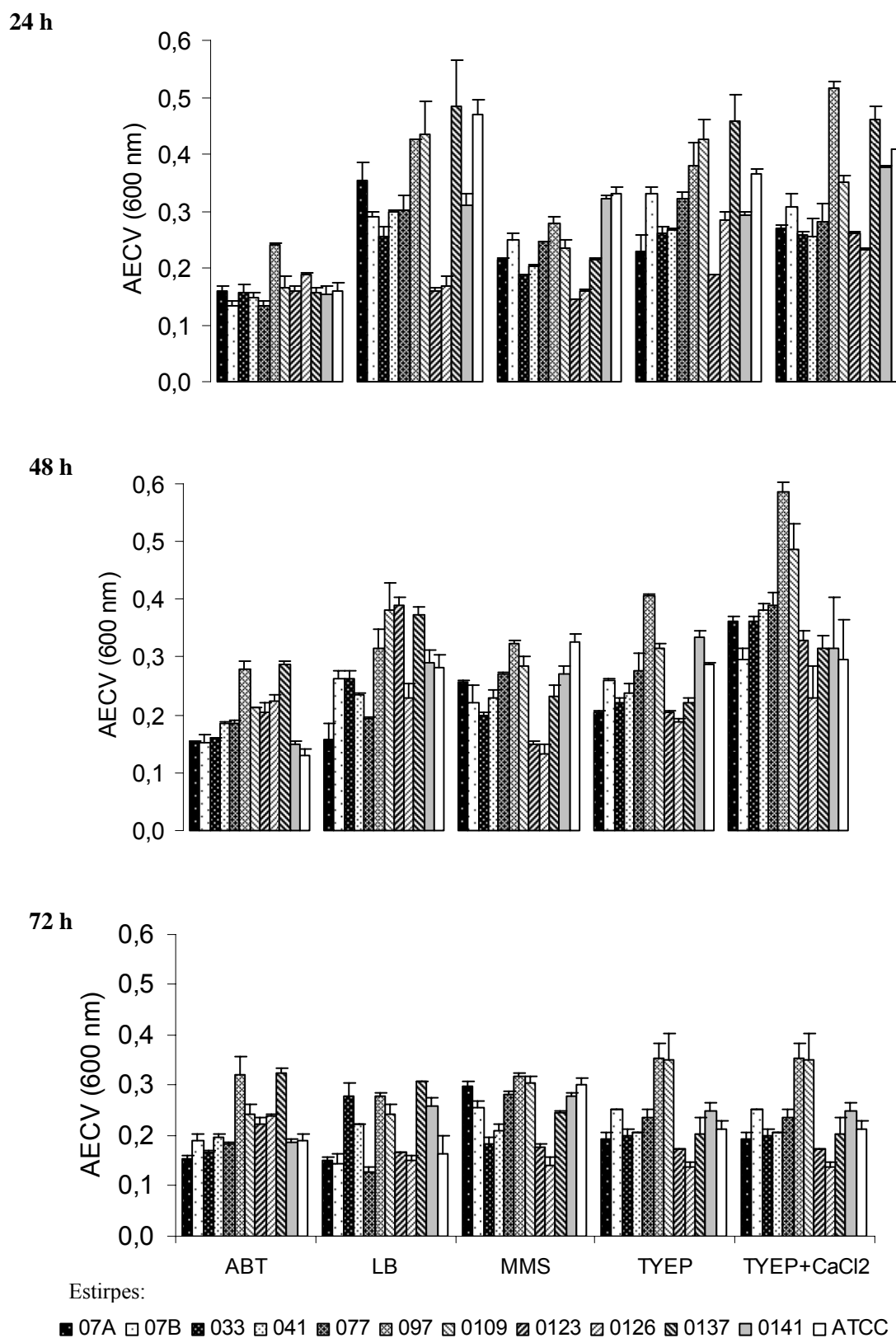


Figura 2 – Formação de biofilmes por culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de  $\text{CaCl}_2$  após incubação a 26 °C por 24, 48 e 72 h. (AECV) Absorvância do extrato do cristal violeta.

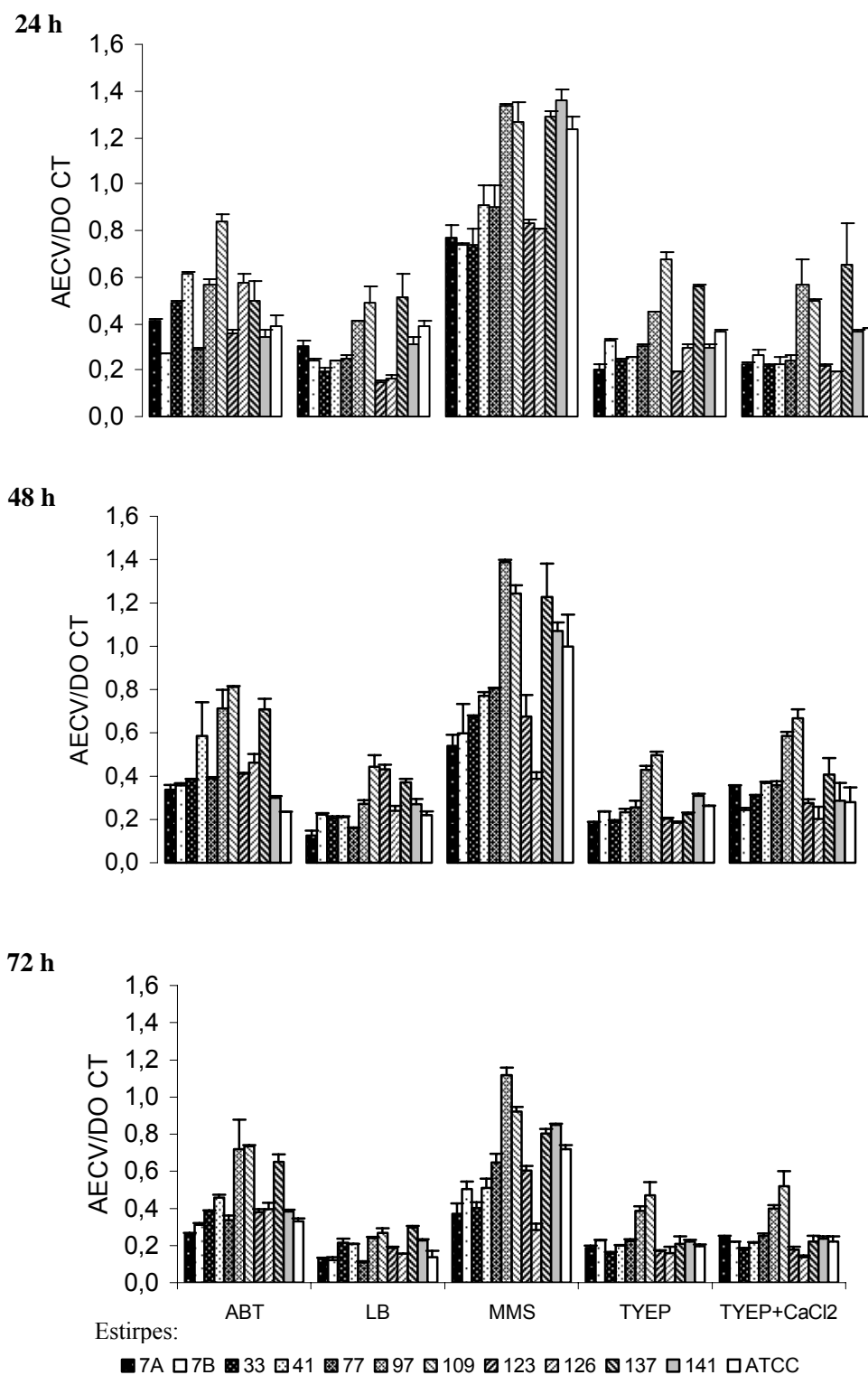


Figura 3 – Razão entre a densidade óptica do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais de estirpes de *P. fluorescens* cultivadas em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após incubação a 26 °C por 24, 48 e 72 h. O biofilme foi avaliado dividindo-se a absorvância do extrato do cristal violeta pela densidade óptica obtida para as células totais. (AECV) Absorvância do extrato do cristal violeta; (CT) células totais.

Este resultado indicou que, embora meios complexos e nutricionalmente mais ricos tenham favorecido o crescimento, não estimularam a adesão celular. De acordo com O'Toole e Kolter (1998), existem condições ambientais que favorecem o crescimento da célula, mas não promovem a formação de biofilmes. Os resultados demonstram, ainda, que grande parte das células presentes no MMS se aderiu ao biofilme (Figura 3). O efeito da composição nutricional do meio e das condições ambientais sobre a formação de biofilmes já foi demonstrado (BROWN et al., 1977; COSTERTON et al., 1995; WIMPENNY e COLASANTI, 1997; O'TOOLE e KOLTER, 1998; CONWAY et al., 2002). COSTERTON et al. (1999) verificaram que a formação de biofilmes maduros pode ser dependente de uma soma de adaptações celulares e ciclos de crescimento influenciados pelas condições de difusão de nutrientes na comunidade. Variando-se as condições nutricionais e de fluxo do meio, o desenvolvimento dos biofilmes pode seguir diferentes rotas, visto que as bactérias não percebem que estão dentro do biofilme, por isso respondem a condições ambientais locais como estresse e gradientes de nutrientes (KJELLEBERG e MOLIN, 2002). A formação de biofilmes bacterianos em laboratório é difícil, pois os meios comumente empregados nos cultivos possuem muitos nutrientes (POUSEN et al., 1999). Na indústria de alimentos, as células planctônicas são induzidas a tornarem-se sésseis, quando os nutrientes são limitados. Os microrganismos buscam capturar a matéria orgânica aderida nas superfícies de processamento, o que resulta na adesão celular e iniciação do processo de formação do biofilme. Na forma sésseis, os microrganismos tornam-se resistentes ao calor, à luz, ao estresse hídrico e a vários agentes antimicrobianos, incluindo os antibióticos. O principal sinal ambiental que determina a transição entre organismos unicelulares a agregados multicelulares parece ser o estresse nutricional, sugerindo que formação de biofilmes seja uma resposta adaptativa que favorece a sobrevivência em condições desfavoráveis (WEBB et al., 2003). RICE e KOH (2005) verificaram que a redução ou limitação de nutrientes desempenha um papel na transição entre um biofilme filamentoso de *S. marcescens* para um biofilme na forma de microcolônia. Quando a concentração de glicose e de casaminoácidos no meio foi reduzida dez vezes, o tamanho e a frequência das microcolônias foram aumentados.

O MMS utilizado nesse estudo é rico em íons que podem ter favorecido a maior formação de biofilmes. Cátions divalentes como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  podem influenciar diretamente a formação dos biofilmes por meio de interações

eletrostáticas e, indiretamente, via processos de adesão dependentes da fisiologia, pois podem possuir funções celulares importantes como, por exemplo, os co-fatores de enzimas (FLETCHER et al., 1988). A presença de cátions como o  $\text{Ca}^{2+}$  favorece as ligações cruzadas entre células e entre células e superfícies (KOERSTGENS et al., 2001).

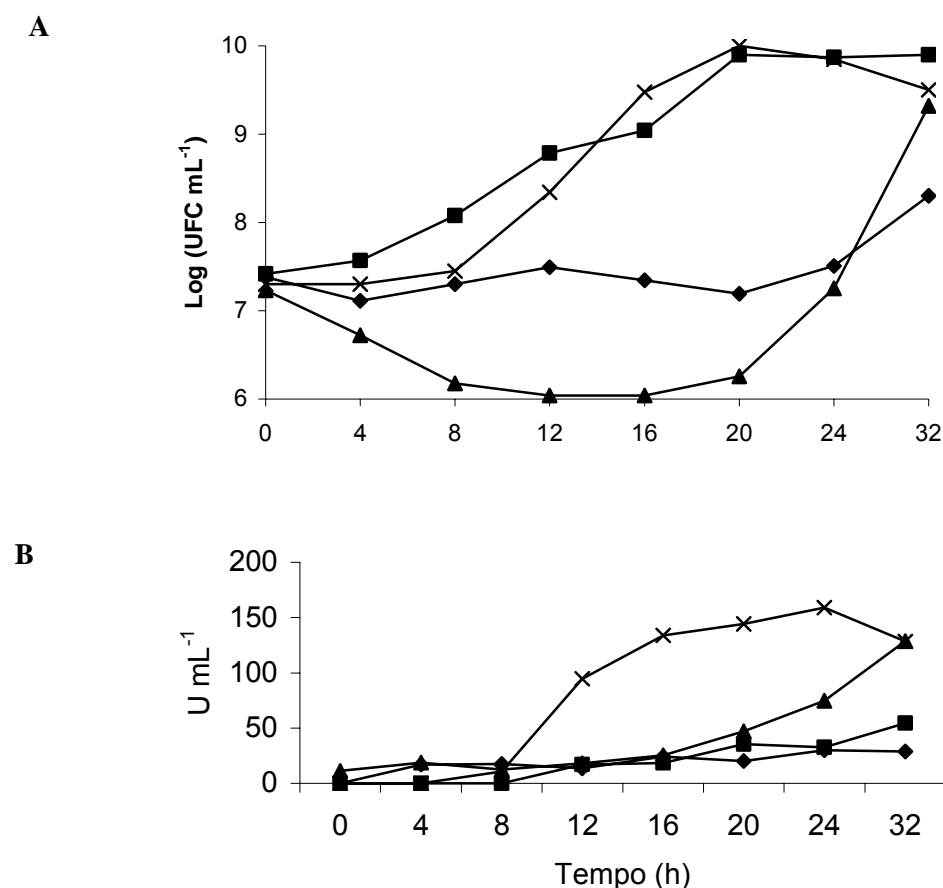
Neste ensaio, também foram obtidos maiores valores da razão entre crescimento e adesão celular ( $P < 0,05$ ) nos tempos 24 e 48 h de incubação e um declínio após 72 h, independente do meio de cultura avaliado (Figura 3). Estes resultados sugerem que, com 72 h de incubação, ocorreu desagregação das células do biofilme, possivelmente em razão da redução ou esgotamento dos nutrientes do meio. Vários mecanismos que favorecem a dissolução dos biofilmes e, conseqüentemente a dispersão das células, têm sido propostos. A dissolução dos biofilmes em *E. coli* está sob o controle do regulador global do carbono CsrA (carbon storage regulator) (JACKSON et al., 2002). As enzimas que degradam a matriz de exopolissacarídeos, por exemplo, polissacarídeoliasas, também têm atuação importante na dissolução dos biofilmes de vários microrganismos (OTT et al., 2001; KAPLAN et al., 2003). O processo de dispersão é desencadeado pela limitação de nutrientes dentro das microcolônias. Sob essas condições, é vantajoso para uma fração da população se separar e colonizar novos nichos onde as condições de crescimento são mais favoráveis (STEMBERG et al., 1999).

A capacidade de formar biofilme variou entre as 12 estirpes avaliadas, sendo que as estirpes 097, 0109, 0137 e 0141 foram as que mais se aderiram às microplacas (Figura 3). A análise dos dados obtidos resultou na seleção do MMS e das estirpes *P. fluorescens* 097 e 0109 para os experimentos subseqüentes.

### **2.3.2. Atividade proteolítica das células livres e planctônicas de *P. fluorescens***

A população de células de *P. fluorescens* 097 atingiu valores similares em meio LB e em TYEP adicionado de 0,25 % de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 4A), mas a atividade proteolítica em LB não ultrapassou cinco unidades de enzimas proteolíticas  $\text{h}^{-1}$  (Figura 4B). Atividade proteolítica baixa também foi constatada no meio ABT (Figura 4B). No meio MMS, a atividade proteolítica foi detectada a partir de 24 h de incubação e coincidiu com o aumento do número de células viáveis (Figura 4A e B).

O elevado teor de cálcio no meio TYEP pode ter contribuído para a elevada atividade proteolítica de *P. fluorescens* 097 cultivada nesse meio (Figura 4B), uma vez que as proteases de *Pseudomonas* contêm íons cálcio na sua estrutura química. A secreção e a atividade dessas enzimas são aumentadas na presença deste íon. (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). Resultados similares foram obtidos por Pinto (2005), quando adicionou 0,25 % de CaCl<sub>2</sub> em meio TYEP e verificou um aumento de até 100 % na atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A. Uma maior produção de proteases também foi verificada por Liao e McCallus (1998) e Rajmohan et al. (2002) na presença de íons Ca<sup>+2</sup>, mas esses autores não concluíram se os íons estavam diretamente envolvidos na regulação da produção de AprX ou, simplesmente, na estabilização da enzima após a sua síntese.



Figuras 4 – Crescimento (A) e atividade proteolítica (B) de *P. fluorescens* 097 cultivada a 26 °C, por 32 h, nos meios ABT (◆), LB (■), MMS (▲), TYEP adicionado de 0,25 % de CaCl<sub>2</sub> (X).

### 2.3.3. Detecção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* produzidas por *P. fluorescens*

As 12 estirpes de *P. fluorescens* avaliadas apresentaram resultado negativo para a produção de AHL na presença das estirpes monitoras *C. violaceum* CV026, no ensaio de indução da produção de violaceína, *E. coli* pSB403, *S. liquefaciens* MG44 e para a produção de PQS na presença da monitora *P. aeruginosa* PAO-R1 (Tabela 3), indicando que essas estirpes não produzem AHLs de cadeias laterais de comprimento inferior a oito carbonos. Resultado semelhante foi encontrado por Pinto (2005), ao avaliar oito isolados de *P. fluorescens* obtidos do leite com as estirpes monitoras *E. coli* pSB403 e *C. violaceum* CV026 no ensaio de indução da produção de pigmento. Na literatura, existem relatos da produção da molécula PQS apenas pela espécie *P. aeruginosa* (PESCI et al., 1999). A estirpe monitora *C. violaceum* CV026 é um mutante incapaz de produzir AHL e violaceína. A molécula mais ativa para a indução do pigmento é C6-AHL, a AHL natural de *C. violaceum*. Outras AHLs que induzem essa monitora são C6-3oxo-AHL e C8-AHL, que são seis vezes menos ativas que C6-AHL; C8-3-oxo-AHL, que é seis vezes menos ativa e C4-AHL, 30 vezes menos ativa (MCCLEAN et al., 1997; STEINDLER e VENTURI, 2006). *E. coli* (pSB403) é mais sensível à sua AHL cognata C6-3oxo-AHL, mas apresenta também sensibilidade a C6-AHL, C8-oxo-AHL e C8-AHL (WINSON et al., 1998).

Tabela 3 – Avaliação da produção de AHL e de PQS e por estirpes de *P. fluorescens*

Isolados avaliados	CV 026 (1)		(2)	(3)	A136 (4)			WCF 47 (5)			KYC55 (6)			(7)
	Indução	Inibição			pSB403	MG44	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	
07A	-	+	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	-
07B	-	+	-	-	-	-	+	-	+	++	+++	+++	+++	-
033	-	+	-	-	-	-	++	-	+	++	+++	+++	+++	-
041	-	+	-	-	-	-	+	-	+	++	+++	+++	+++	-
077	-	+	-	-	-	-	++	-	+	++	+++	+++	+++	-
097	-	+	-	-	-	-	+	-	+	++	+++	+++	+++	-
0109	-	+	-	-	-	-	+++	-	+	++	+++	+++	+++	-
0123	-	+	-	-	-	-	++	-	-	+	+++	+++	+++	-
0126	-	+	-	-	-	-	+++	-	-	+	+++	+++	+++	-
0137	-	+	-	-	-	-	++	-	-	+	-	+++	+++	-
0141	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+++	+++	-
ATCC* 13525	-	+	-	-	-	-	++	-	-	+	+++	+++	+++	-

Estirpes monitoras: (1) *C. violaceum* CV026, (2) *E. coli* pSB403, (3) *S. liquefaciens* MG44 (4) *A. tumefaciens* A136, (5) *A. tumefaciens* WCF47, (6) *A. tumefaciens* KYC55, (7) *P. aeruginosa* PAO-R1. Intensidade do sinal: (+) baixa, (++) média, (+++) alta. \*ATCC: American Type Culture Collection.

As três estirpes de *A. tumefaciens* foram sensíveis às moléculas sinalizadoras produzidas pelos isolados de *P. fluorescens* avaliados (Tabela 1), sendo que *A. tumefaciens* KYC55 produziu a enzima  $\beta$ -galactosidase que foi detectada a partir de 24 h de incubação. As demais apresentaram resposta após 48 e 72 h de incubação indicando que há diferença quanto à sensibilidade entre as estirpes. Os 12 isolados produziram molécula sinalizadora capaz de inibir a produção de violaceína por *C. violaceum* CV026. Estes resultados indicam uma produção potencial de AHLs de cadeias superiores a oito carbonos pelas estirpes avaliadas. Pinto (2005) também observou que o extrato de *P. fluorescens* induziu a estirpe *A. tumefaciens* A136 e inibiu a produção de pigmento por *C. violaceum* CV026. Alguns autores também verificaram a produção de AHLs por estirpes de *P. fluorescens*. Shaw et al. (1997) identificaram, por meio de cromatografia em camada delgada revelada com a estirpe *A. tumefaciens* NT1(pDCI41E33), cinco tipos de AHL com substituição hidroxil, sendo N-hexanoil, N-octanoil e N-decanoil-L homoserinas lactonas produzidas pela estirpe *P. fluorescens* 2-79. Quando *P. fluorescens* F113 foi estriada em paralelo às estirpes biosensoras *C. violaceum* CV026 e *E. coli* (pSB1075) capazes de detectar AHLs de 4 a 8 ou de 10 a 14 carbonos, nenhuma resposta foi detectada. Entretanto, três frações, obtidas do meio de cultura por extração com diclorometano seguido de separação por HPLC de fase reversa, ativaram as estirpes biosensoras. A caracterização das moléculas por espectrometria de massa revelou a existência de N-(3-hidroxi-7-cis-tetradecenoil) homoserina lactona, N-decanoilhomoserina lactona e HHL (Laue et al., 2000). Por meio de cromatografia líquida de alta pressão acoplada a espectrometria de massa, foi demonstrado que *P. fluorescens* 5064 produz N-3-hidroxi-octanoil-homoserina lactona (Cui, 2004). Em razão de diferenças no perfil de produção de AHL por estirpes de *P. fluorescens*, Cui (2004) sugeriu haver correlação entre o habitat e o perfil de produção de AHL nessa espécie.

Os resultados sugerem que as estirpes de *P. fluorescens* avaliadas produzem algum tipo de AHL ou outra molécula sinalizadora capaz de ativar os sistemas monitores de *A. tumefaciens* e *C. violaceum* no ensaio de inibição. Mais estudos são necessários para caracterizar a estrutura química dessas moléculas.

### 2.3.4. Efeito de AHLs no crescimento e na formação de biofilme de *P. fluorescens*

Os autoindutores sintéticos ABL e HHL adicionados ao MMS não afetaram o crescimento e a formação de biofilme por *P. fluorescens* 097 (Figura 5). Esses resultados confirmam os dados obtidos no ensaio anterior (item 2.3) e sugerem que as moléculas de cadeia lateral contendo quatro (ABL) e seis carbonos (HHL), sem substituições, não são produzidas por *P. fluorescens* e, portanto, não estão envolvidas na regulação da formação de biofilmes nessa estirpe. Entretanto, Allison et al. (1998) verificaram que a adição de HHL, na concentração de  $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ ) ao meio de cultura, aumentou a formação de biofilme pela estirpe *P. fluorescens* B52. Os autores concluíram que a adesão e a formação de biofilme em *P. fluorescens* são influenciadas pela presença de AHLs. A adição de ABL ao meio de cultivo reduziu a fase lag e a taxa de crescimento exponencial de dois isolados de *P. fluorescens* (WHAN et al., 2000), sugerindo possível ocorrência do fenômeno QS nessas estirpes.

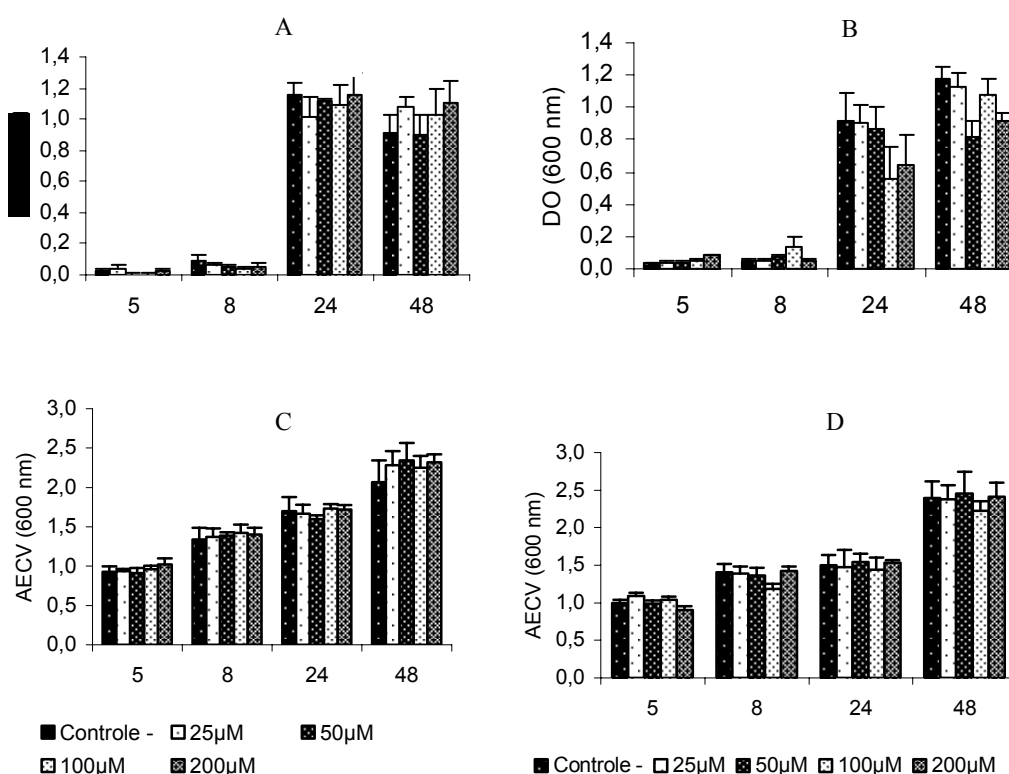


Figura 5 – Densidade óptica de culturas *P. fluorescens* 097 em microplacas de poliestireno contendo MMS adicionado de ABL sintética (A) e HHL sintética (B). Absorvância do extrato do cristal violeta removido de células sésseis (C e D).

### 2.3.5. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável por *P. fluorescens*

Imediatamente após a imersão dos cupons de aço inoxidável nos meios MMS e TYEP, constatou-se grande número células de *P. fluorescens* 097 e 0109 aderidas (Figura 6). No decorrer do período de incubação, verificou-se pouca variação na população de células sésseis, provavelmente em razão da renovação dos meios de cultura inoculados a cada 24 h. Este resultado diferiu do obtido no ensaio de formação de biofilmes em microplacas, onde o meio de cultura foi inoculado apenas no tempo inicial.

O número elevado de células aderidas aos cupons imersos nos meios MMS e TYEP confirmou que as estirpes avaliadas apresentam grande potencial para formar biofilmes. Além disso, ambos os meios utilizados contêm  $\text{CaCl}_2$  em sua composição, que pode ter favorecido a formação de microcolônias na superfície do aço inoxidável. Koerstgens et al. (2001) afirmaram que alguns íons contribuem para a formação de ligações cruzadas entre as células nos biofilmes e entre as células e a superfície.

As células sésseis dos biofilmes de ambas as estirpes avaliadas apresentaram atividade proteolítica inferior a 18 unidades de enzimas  $\text{mL}^{-1}$  durante o período de incubação (Figura 7). Células sésseis em meio TYEP suplementado com  $\text{CaCl}_2$  não apresentaram atividade proteolítica maior do que aquelas em meio MMS, como observado anteriormente, em células planctônicas (item 3.2) (Figura 7).

Machado (2006) observou incremento de até 52 % na atividade proteolítica no meio de cultura contendo células planctônicas, em razão da presença de cupons contendo biofilmes, indicando que células aderidas e, ou em biofilmes podem secretar enzimas para o meio externo. Em razão desses resultados, essa autora sugeriu que biofilmes formados em superfícies de equipamentos de indústrias de laticínios podem contribuir para o aumento da atividade proteolítica associada à deterioração do leite e de produtos lácteos. Na caracterização de biofilmes de *P. fluorescens*, Simões et al. (2005) detectaram uma quantidade de 59,9 mg de proteínas extracelulares por grama de biofilme, enquanto o total de proteínas intracelulares alcançou valores de  $150 \text{ mg g}^{-1}$  de biofilme. Em biofilmes formados por outras bactérias, constatou-se também a produção de proteases extracelulares. Células aderidas de espécies mesofílicas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformes* e *Bacillus cereus*, isoladas de indústrias de laticínios,

produziram enzimas proteolíticas (Lyndsay et al., 2000). Okadak e Trafny (2005) verificaram que células de *P. aeruginosa* em biofilmes formados em superfícies de membranas Milipore, suspensas em meio nutriente e tratadas com ciprofloxacina secretaram proteases para o meio externo.

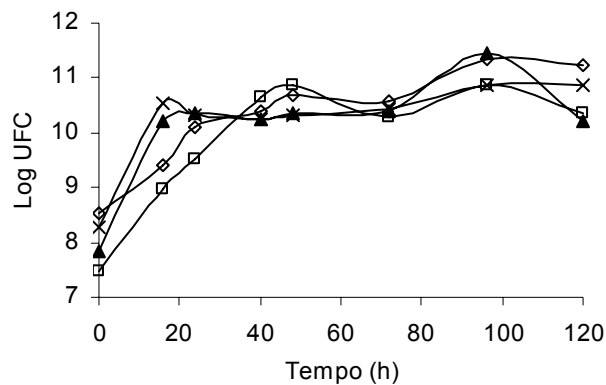


Figura 6 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônia de células de *P. fluorescens* 097 e 0109 aderidas em cupons de aço inoxidável de 24 cm<sup>2</sup> de área. (◇) 097 em MMS; (▲) 097 em TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub>; (□) 0109 em MMS; (x) 0109 em TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub>.

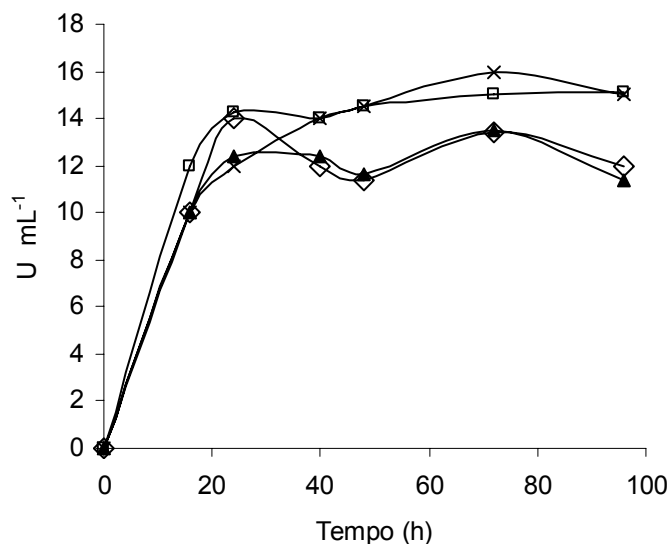


Figura 7 – Atividade proteolítica de células de *P. fluorescens* 097 e 0109 aderidas em cupons de aço inoxidável de 24 cm<sup>2</sup> de área. (◇) 097 em MMS; (▲) 097 em TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub>; (□) 0109 em MMS; (x) 0109 em TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub>.

### 2.3.6. Observações microscópicas de biofilmes

As imagens obtidas por microscopia de epifluorescência das estirpes *P. fluorescens* 097 e 0109 (Figuras 8 e 9) evidenciam a ocorrência de adesão de grande número de células imediatamente após os cupons entrarem em contato com as culturas bacterianas. Também confirmaram a permanência de grande número de células aderidas ao cupom de aço com o prolongamento da incubação e mostraram que os biofilmes formados por essas estirpes permaneceram estáveis ao longo do tempo. Pela observação das imagens é possível notar regiões com multicamadas de células que caracterizam a presença de microcolônias comuns nos biofilmes bacterianos (Figuras 8 e 9). Machado (2006) também observou monocamadas de células nos cupons de aço inoxidável, removidos minutos após serem imersos nos meios TYEP e em LDR a 12 %. Em cupons removidos após 24 h de cultivo em LDR a 12 %, foram observados, além de monocamadas, aglomerados em multiplanos.

O número de células dos biofilmes de ambas as estirpes avaliadas manteve-se elevado até o final do tempo de incubação e atingiu, aproximadamente,  $10^{11}$  UFC por cupon (Figura 7). Entretanto, as observações microscópicas indicaram alterações morfológicas do mesmo com 120 h de cultivo caracterizadas por regiões com camadas de células menos espessas e mais espaçadas, em relação aos demais tempos de incubação, provavelmente, como consequência de desagregação celular (Figuras 8 e 9). Allison et al. (1998) também observaram a ocorrência de desagregação em biofilmes de *P. fluorescens* com 60 h de incubação. Esses biofilmes apresentaram-se substancialmente reduzidos e foram observadas imagens claras de células únicas, desnudas de exopolissacarídeos associadas às superfícies. A deficiência nutricional das células bacterianas pode levar à desagregação por um mecanismo desconhecido que permite que às bactérias busquem habitats ricos em nutrientes (O'TOOLE et al., 2000). Essa hipótese é reforçada pelas observações de Sauer et al. (2002) que compararam dois géis de proteína para mostrar que os padrões de expressão por células de *P. aeruginosa* em dispersão são similares aos das células em estado planctônico.

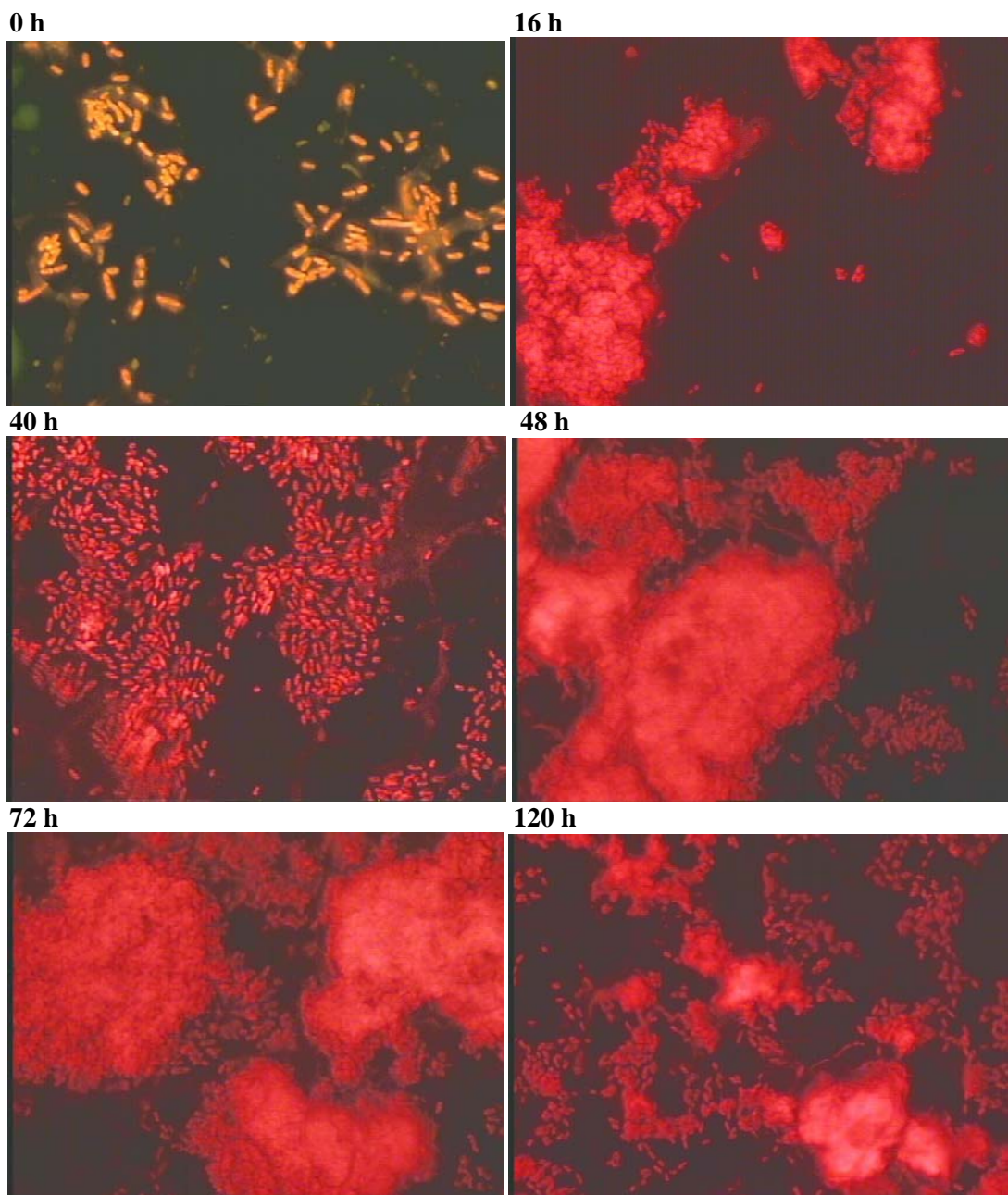


Figura 8 – Microfotografias de biofilmes formados por *P. fluorescens* 097 em cupons de aço inoxidável imersos em MMS e incubados a 26 °C no período de 0 a 120 h.

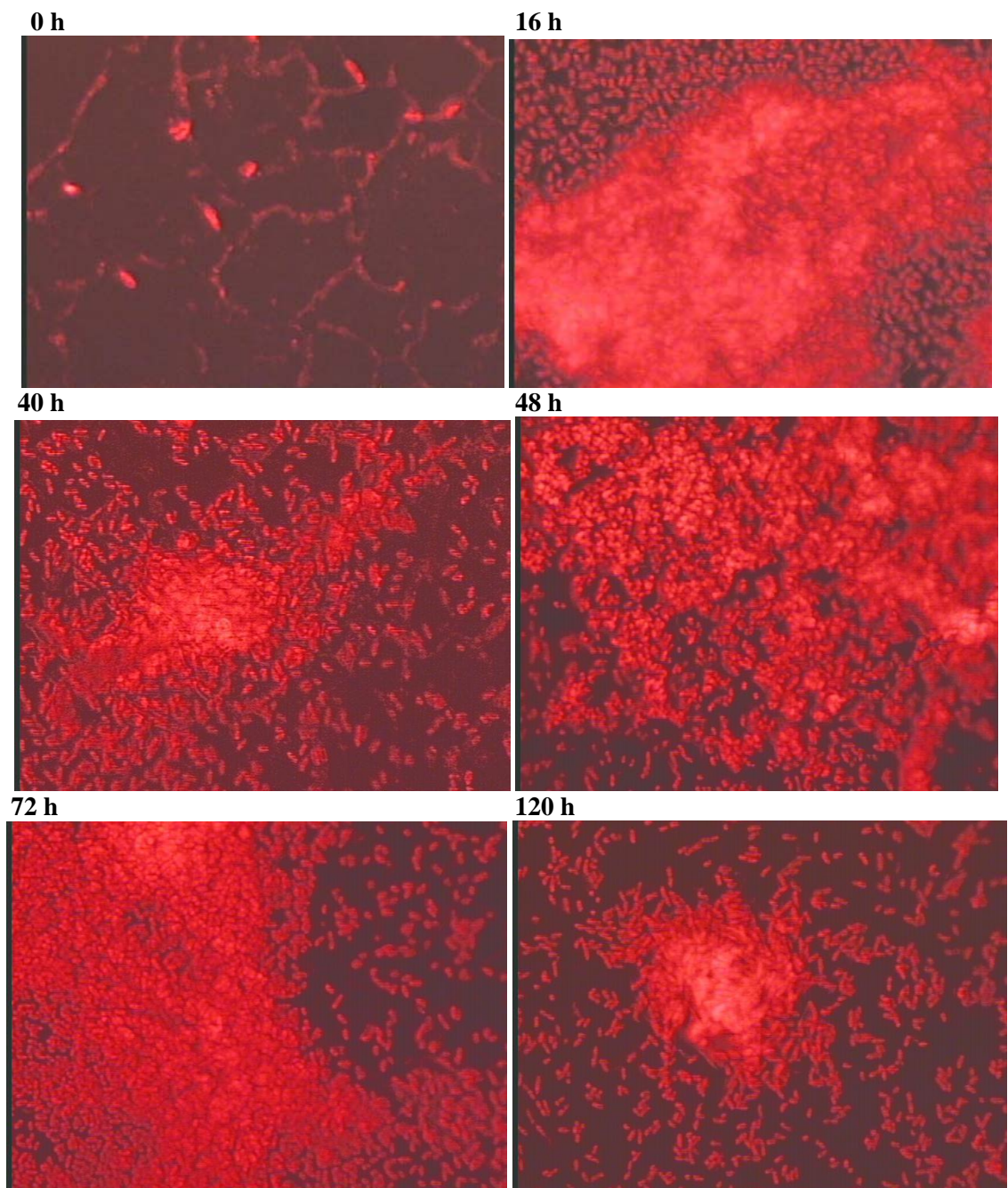


Figura 9 – Microfotografias de biofilmes formados por *P. fluorescens* 0109 em cupons de aço inoxidável imersos em MMS e incubados a 26 °C no período de 0 a 120 h.

### 2.3.7. Detecção de moléculas sinalizadoras nos biofilmes formados por *P. fluorescens*

Uma vez que somente as estirpes *A. tumefaciens* A136, WCF47, KYC55 e *C. violaceum* CV026 foram capazes de detectar as moléculas sinalizadoras produzidas pelas 12 estirpes de *P. fluorescens* (item 3.3), selecionaram-se duas dessas monitoras para o ensaio de detecção de AHL diretamente nos biofilmes. Dentre as estirpes de *A. tumefaciens*, escolheu-se a WCF47 por apresentar grau médio de sensibilidade e por ser menos susceptível à ativação dos genes que sintetizam a enzima  $\beta$ -gal por substâncias diferentes das moléculas sinalizadoras.

Os resultados obtidos no teste de inibição da produção de pigmento por *C. violaceum* CV026 indicaram que biofilme de *P. fluorescens* 097 produz substância capaz de inibir parcialmente parte da produção de violaceína. Essa constatação é baseada na redução da pigmentação violeta produzida por *C. violaceum* na presença de biofilme de *P. fluorescens* 097 (Figura 10). A estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47 também apresentou resposta positiva para a presença outra molécula sinalizadora de QS na presença de biofilme de *P. fluorescens* 097 formado em cupom de aço inoxidável (Figura 10).

A técnica de detecção de AHL *in situ*, desenvolvida neste estudo, mostrou ser uma ferramenta prática, simples e eficiente e representa um método alternativo de estudo para relacionar o QS com a formação de biofilmes. Utilizou-se a exposição dos cupons à radiação ultravioleta como forma de eliminar parte da população de células sésseis, sem destruir as moléculas sinalizadoras. A imersão de um cupom de aço inoxidável contendo biofilme em meio de cultura não resultou em turvação detectável até 24 h de incubação, período suficiente para observar os resultados do ensaio de detecção *in situ*. Esse controle assegurou que a ativação dos monitores no ensaio de detecção *in situ* ocorreu por moléculas sinalizadoras previamente presentes nos biofilmes, e não por aquelas produzidas durante crescimento bacteriano durante o ensaio. Entretanto, outras metodologias que impeçam a transferência das células sésseis para o ágar devem ser avaliadas.

A presença de substâncias ativadoras dos monitores nos biofilmes de *P. fluorescens* 097 indica que o sistema QS pode estar envolvido na regulação da formação de biofilmes. A regulação da formação de biofilmes pelo sistema QS já foi observada em estudos com outras bactérias como *P. aeruginosa* (De KIEVIT et al.,

2001), *Burkholderia cepacia* (HUBER et al., 2001), *A. hydrophila* (LYNCH et al., 2002) e *A. tumefaciens* (AN et al., 2006).

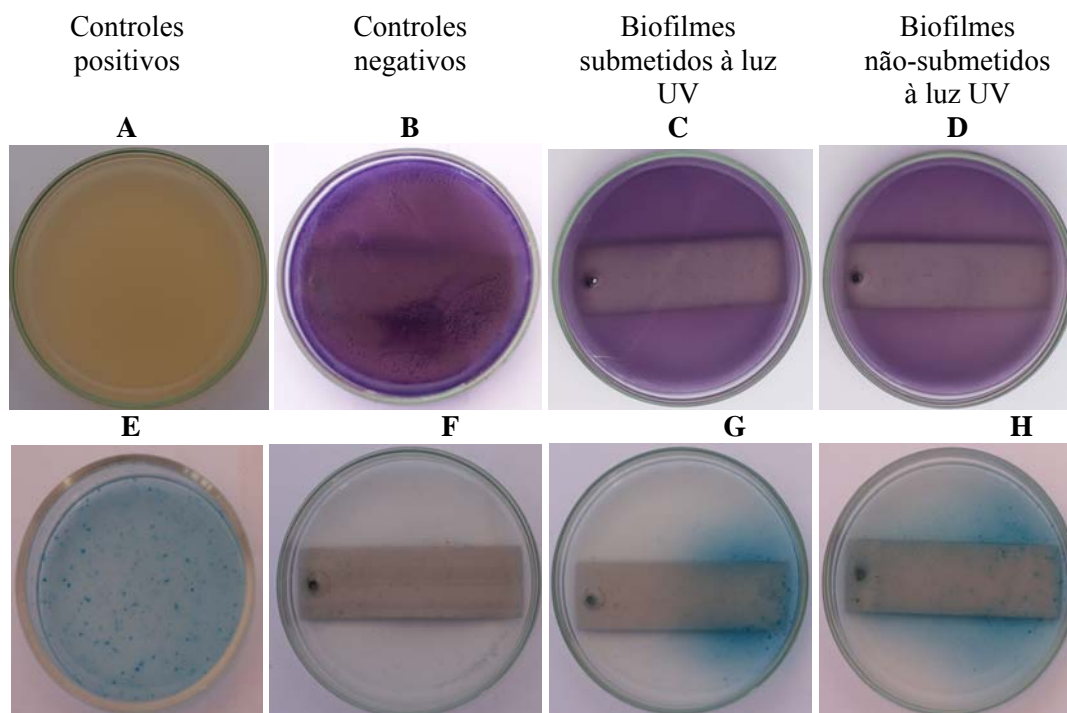


Figura 10 – Detecção de N-acil-homoserinas lactonas por estirpes monitoras em biofilmes formados por *P. fluorescens* 097 durante 48 h em MMS e submetidos ou não à luz ultravioleta por 30 min. A a D referem-se ao ensaio realizado com a estirpe monitora *C. violaceum* CV026; E a H referem-se ao ensaio com a estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47.

### 2.3.8. Detecção de homoserinas lactonas aciladas nos extratos de células sésseis e planctônicas

Extratos de células sésseis e planctônicas de *P. fluorescens* 097, obtidos após 24 e 48 h de incubação adicionados ao meio de cultivo de *C. violaceum* CV026, resultaram na formação de dois halos de inibição: um do crescimento e outro de formação de pigmento pela estirpe monitora (Figura 11). A inibição do crescimento ocorreu provavelmente em razão da extração de antibióticos produzidos pela estirpe-teste. Muitas espécies do gênero *Pseudomonas*, incluindo *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* isoladas do solo, produzem antibióticos como fenazina-1-ácido carboxílico e derivados. Esses metabólitos secundários exibem atividade

antimicrobiana contra muitos organismos procariotos e eucariotos e, por isso, a síntese desses compostos confere vantagem adaptativa, quando em competição com outros microrganismos do solo (KHAN et al., 2005). Outro exemplo de antibiótico produzido por *P. fluorescens* NCIMB 10586 é o ácido pseudomônico ou mupirocina (El-Sayed et al., 2001). A regulação de ambos os antibióticos mencionados ocorre por meio do sistema QS. Segundo McClean et al. (1997), o ensaio de inibição de *C. violaceum* CV026 deve ser interpretado com cuidado, visto que muitas bactérias produzem substâncias antimicrobianas. Os autores afirmaram que a região despigmentada deve ser opaca, e não transparente, significando que não houve inibição do crescimento da biosensora.

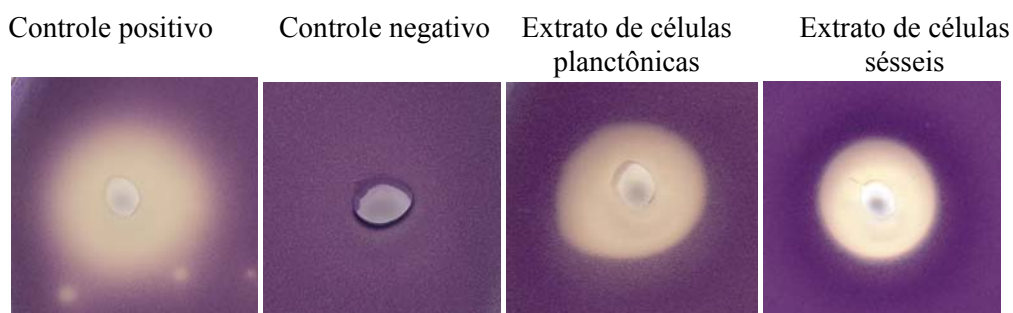


Figura 11 – Detecção de AHLs produzidas pelas células sésseis e planctônicas de *P. fluorescens* 097 após 48 h de incubação, utilizando-se a estirpe monitora *C. violaceum* CV026.

O resultado apresentado na Figura 12 evidenciou que *P. fluorescens* 097, tanto na forma livre quanto na planctônica, produz molécula sinalizadora capaz de ativar o sistema QS de *A. tumefaciens* WCF47, o que confirmou mais uma vez os resultados apresentados no item 3.3. Segundo Zhu (2003), as estirpes *A. tumefaciens* WCF47 e KYC55 são biosensores que apresentam maior sensibilidade em relação às demais e ampla especificidade aos substratos, conseguindo detectar AHLs com cadeia acil de diversos comprimentos. As proteínas TraI e TraR de *A. tumefaciens* são homólogas das proteínas LuxI e LuxR de *Vibrio fischeri*. TraI sintetiza o autoindutor N-3-oxooctanoil-HSL (OOHL), enquanto TraR é uma ativadora dos genes *tra*, *trb* e *rep* do plasmídeo Ti dependente de OOHL (PIPPER et al., 1993; FUQUA e WINANS, 1994; PAPPAS e WINANS, 2003). Tem sido reportado que TraR também detecta várias dicetopiperazinas (Holdem et al., 1999).

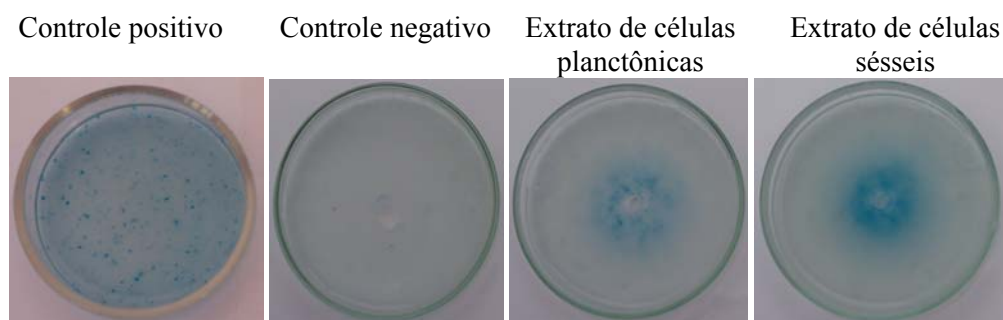


Figura 12 – Detecção de AHLs produzidas pelas células sésseis e planctônicas de *P. fluorescens* 097 após 48 h de incubação utilizando-se a estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47.

### 2.3.9. Caracterização das AHLs

Embora os extratos das células sésseis e planctônicas da estirpe *P. fluorescens* 097 tenham induzido a produção de  $\beta$ -gal pela estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47, o mesmo não foi observado quando se aplicaram os mesmos extratos na placa de cromatografia em camada delgada (Figura 13). Provavelmente, ocorreu algum fenômeno que degradou a molécula sinalizadora durante o processo de separação das amostras ou uma difusão excessiva no suporte sólido que promoveu sua diluição, tornando-a concentração insuficiente para estimular o monitor. Resultado contrário ocorreu quando Laue et al. (2000) realizaram um estudo com a estirpe *P. fluorescens* F113. Essa estirpe não induziu resposta nas monitoras *C. violaceum* CV026, capaz de detectar AHLs de quatro a oito carbonos e em *E. coli* (pSB401), capaz de detectar AHLs de 10 a 14 carbonos de comprimento de cadeia acil. Entretanto, ao realizar a extração do sobrenadante da cultura com diclorometano, seguido de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), três das frações obtidas foram capazes de ativar as estirpes monitoras. Por meio da espectrometria de massa, as AHLs foram subsequenteiramente caracterizadas como N-(3-hidroxi-7-cistetradecanoil) homoserina lactona, N-decanoil homoserina lactona e N-hexanoil homoserina lactona.

Os resultados obtidos indicam a necessidade de mais estudos a fim de se investigar a causa da ausência de resposta na estirpe monitora utilizada na biorevelação da CCD e para a identificação das moléculas indutoras dos monitores usados. A realização da espectrometria de massa seria uma alternativa adequada para elucidar o problema em questão.

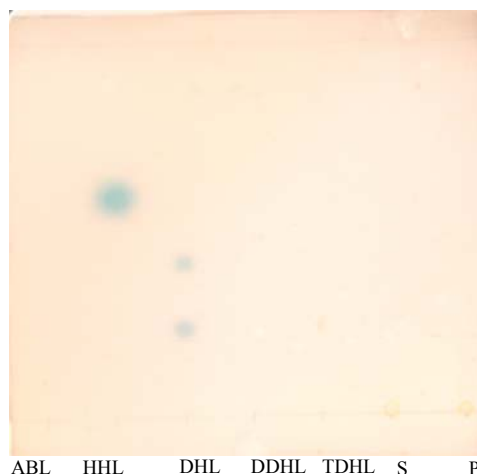


Figura 13 – Cromatografia em camada delgada do extrato de AHLs obtido das células sésseis e planctônicas de *P. fluorescens* 097 cultivadas em MMS por 48 h. Padrões: (ABL)  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona hidrobrometo; (HHL) N-hexanoil-DL-homoserina lactona; (DHL) N-decanoil-DL-homoserina lactona; (DDHL) N-dodecanoil-DL-homoserina lactona; (TDHL) N-tetradecanoil-DL-homoserina lactona; (S) células sésseis; (P) células planctônicas.

### 2.3.10. Efeito da adição de inibidores e de ativadores de *quorum sensing* no crescimento e na formação de biofilme

O crescimento da estirpe *P. fluorescens* 097 em MMS não foi afetado significativamente ( $P > 0,05$ ) pela adição de furanonas (Figura 14A) e de AHLs (Figura 14B). No entanto, as furanonas exerceram efeito inibitório significativo ( $P < 0,05$ ) na formação de biofilmes, particularmente a MF, MTHF e F nas concentrações de 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup> (Figura 14C). Esse efeito inibidor não foi confirmado pelo cálculo da razão entre a D.O. do extrato do cristal violeta e a D.O. das células totais (Figura 14E), mostrando que a formação de biofilme foi diretamente proporcional ao número de células presentes no meio de cultivo.

A adição de AHLs ao MMS exerceu efeito significativo ( $P < 0,05$ ) na formação do biofilme por essa estirpe, mas o teste de Duncan não permitiu diferenciar entre as médias dos tratamentos (Figura 14D). Por meio do cálculo da razão, foi evidenciado que as AHLs não promoveram diferença significativa nos parâmetros avaliados (Figura 14F). Esses resultados sugerem o não-envolvimento de moléculas sinalizadoras do tipo AHL na formação de biofilmes por *P. fluorescens*.

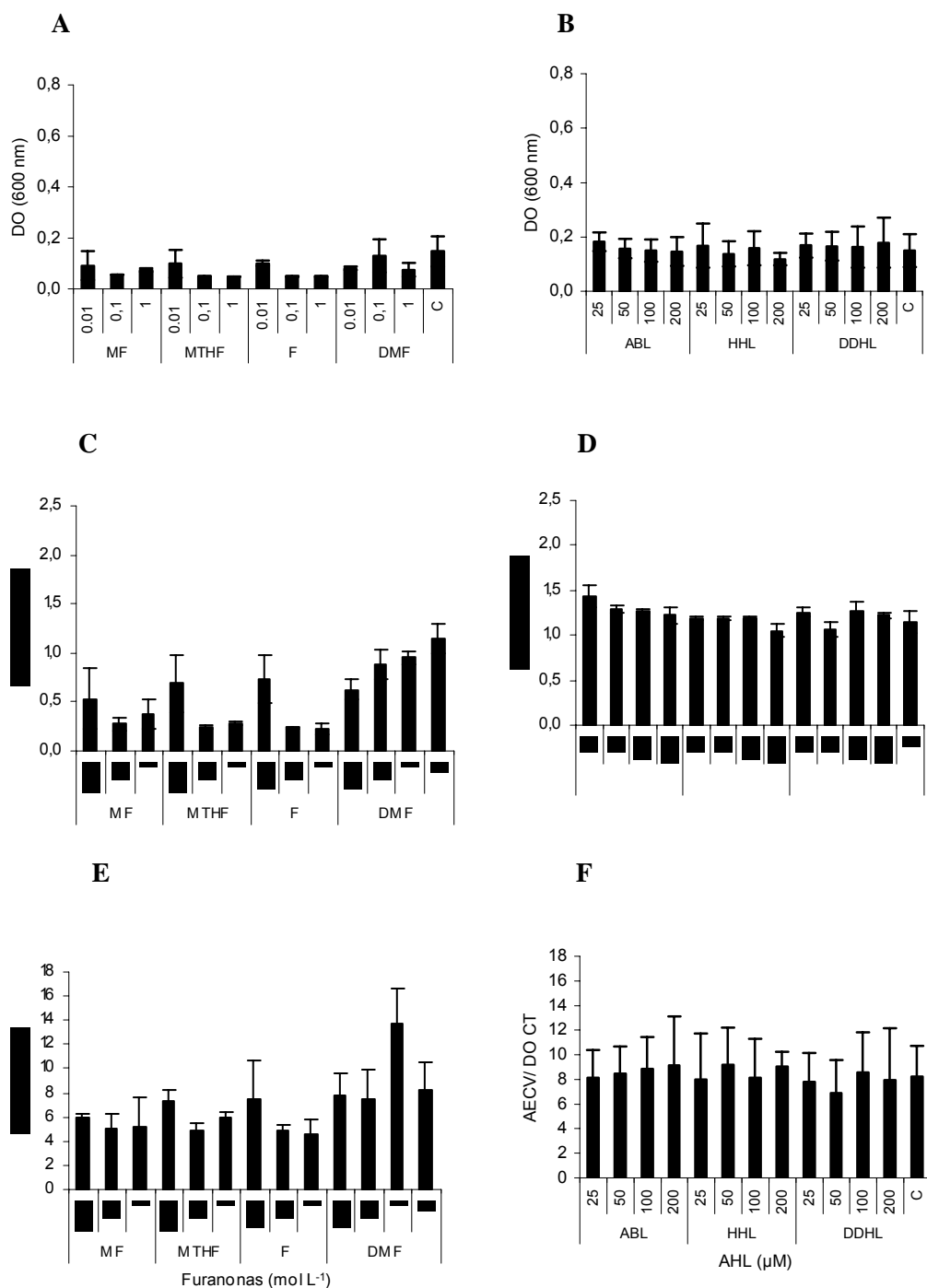


Figura 14 – Crescimento (A e B), formação de biofilme (C e D) e razão entre a absorvância do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais (E e F) de *P. fluorescens* 097 em MMS após 24 h de incubação. MMS adicionado de: 3-metil-2(5H)-furanona (MF); metiltetrahidrofuranona (MTHF); 2(5H)-furanona (F); 2,2-dimetil-3(2H)-furanona (DMF) nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup> e de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL), α-amino-δ-butirolactona (ABL) e N-dodecanoil-DL-homoserina lactona (DDHL) nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μmol L<sup>-1</sup>; (C) Controle; (AECV) absorvância do extrato do cristal violeta; (CT) células totais.

Embora a furanona avaliada não tenha sido efetiva na inibição da formação de biofilme por *P. fluorescens* 097, estudos realizados demonstraram que essas substâncias podem ligar-se à proteína LuxR e às suas homólogas sem ativá-las, ou mesmo promover a degradação dessa proteína, e assim impedir a transcrição de genes envolvidos na regulação da formação dos biofilmes (MANEFIELD et al., 1999; RASMUSSEN et al., 2000; HENTZER et al., 2002).

## 2.4. CONCLUSÕES

A capacidade de formar biofilmes foi variável entre isolados proteolíticos de *P. fluorescens*, sendo que as estirpes 097 e 0109 destacaram-se pelo potencial maior de formar biofilmes em superfícies de poliestireno e em aço inoxidável. Meios de constituição mínima, como o MMS, rico em  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , favoreceram a formação dessas estruturas. Biofilmes densos, com multicamadas de células, foram observados em microscopia de epifluorescência até 96 h de incubação e a desagregação celular foi observada a partir de 120 h.

Embora o MMS tenha favorecido maior adesão das células da estirpe 097, não favoreceu a atividade proteolítica, enquanto no meio TYEP, onde houve menor formação de biofilme, houve maior produção de enzimas proteolíticas.

Moléculas de ABL e HHL adicionadas ao MMS não afetaram a formação de biofilmes por *P. fluorescens* 097 nas condições experimentais avaliadas, sugerindo que essas moléculas não estão envolvidas na regulação da formação de biofilmes nessa estirpe.

Os ensaios de detecção de AHLs produzidas pelas células sésseis de *P. fluorescens* 097 indicaram que essa estirpe produz algum tipo de AHL ou outra molécula sinalizadora capaz de ativar os sistemas monitores de *A. tumefaciens* e *C. violaceum* no ensaio de inibição. Essas moléculas parecem estar envolvidas na regulação da formação de biofilmes pelo sistema QS. O ensaio de difusão do extrato em ágar confirmou essa hipótese.

A ocorrência de moléculas sinalizadoras nas células sésseis e planctônicas de *P. fluorescens* 097 não foi confirmada pela técnica de cromatografia em camada delgada, impossibilitando a elucidação do tipo de molécula que foi capaz de induzir as estirpes monitoras.

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, D., DANHORN, T., FUQUA, C., PARSEK, M.R. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm co cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n.10, p. 3828-3823, 2006.

ANDRADE, N.J., AJAO, D.B., ZOTTOLA, E.A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n.11, p. 1454-1458, 1998.

ALLISON, D.G., RUIZ, B., SanJOSE, C., JASPE, A. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 179-184, 1998.

BROWN, C.M., EILWOOD, D.C., HUNTER, J.R. Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, p. 163-166, 1977.

CHA, C., GAO, P., CHEN, Y-C., SHAW, P.D., FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing by Gram-negative plant-associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.11, p.1119-1129, 1998.

CHRISTENSEN, B.B., HAAGENSEN, A.J., HEYDORN, A., MOLIN, S. Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2495-2502, 2002.

CLARK, D.J., MAALØE, O. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 23, p. 99-112, 1967.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 172-207, 1982.

CONWAY, B.A.D., VENU, V., SPEERT, D.P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5678 -5685, 2002.

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.48, 0. 711-745, 1995.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CRUZ, C.D. Programa Genes: estatística experimental e matrizes. Viçosa: editora UFV, 2006a, 285 p.

CRUZ, C.D. Programa Genes: versão Windows. Viçosa-MG, versão 2006b.

CUI, X. **Regulation of biosurfactant production by quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* 5064, the cause of broccoli head rot disease.** 212p. (PhD Thesis) University of Edinburgh, Edinburgh, 2004.

DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P, IGLEWSKI, B.H., COSTERNON, J. W., GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

De KIEVIT, T.R., GILLIS, R., MARX, S., BROWN, C. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1865-1873, 2001

DUMENYO, C.K., MUKHERJEE, A., CHUN, W., CHATTERJEE, A.K. Genetic and physiological evidence for the production of N-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other plant pathogenic *Pseudomonas* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 569-582, 1998, 1998.

DUNSTALL, G., ROWE, M., WISDOM, B., KILPATRICK, D. Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of *Pseudomonas* spp. of raw milk origin. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 276-280, 2005.

EBERL, L., WINSON, M.K., STERNBERG, C., STEWART, G.S.A.B., CHRISTIANSEN, S., CHRABRA, B., Bycroft, B., WILLIAMS, P., MOLIN, S., GIVSKOV, M. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behavior of *Serratia liquefaciens*. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 127-136, 1996.

ELASRI, M., DELORME, S., LEMANCEAU, P., STEWART, G., LAUE, B., GLICKMANN, E., OGER, P.M, DESSAUX, Y. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1198-1209, 2001

EL-SAYED, A.K., HOTHERSALL, J., THOMAS, C.M. Quorum sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. **Microbiology**, v.147, p.2127-2139, 2001.

ENEROTH, A., AHRNÉ, S., MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v.10, p.325-331, 2000.

EWINGS, K.N., O'CONNOR, R.E., MITCHEL, G.E. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk of in south east Queensland. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 69, p. 65-68-1984.

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.

FUQUA, W.C., WINANS, S.C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2796–2806, 1994.

FUQUA, C., WINANS, S.C., GREENBERG, E.P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR–LuxI family of quorum- sensing transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.727– 751, 1996.

HEYDORN, A., ESBOLL, B., KATO, J., HENTZER, M., MATTHEW, R. P., TIM-NIELSEN, GIVSKOV, M., MOLIN, S. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, 2002.

HOLDEN, M.T.G., CHHABRA, S.R., NYS, 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, P. Quorum sensing crosstalk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Molecular Microbiology**, v.33, p.1254-1266, 1999.

HUBER, B., RIEDEL, K., HENTZER, M., HEYDORN, A., GOTSCHLICH, A., GIVSKOV, M., MOLIN, S., EBERL, L. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v.147, p. 2517-2528, 2001.

JACKSON D.W., SUZUKI K., OAKFORD L., SIMECKA J.W., HART M.E., ROMEO T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 290-301, 2002.

JOSEPH, B., OTTA, S.K., KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.

JUHAS, M., EBERL, L., TÜMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 459-471, 2005.

KAPLAN J.B., RAGUNATH C., RAMASUBBU N, FINE D.H. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. **Journal of Bacteriology**, v.185, p. 4693-4698, 2003.

KHAN, S.R., MAVRODI, D.V., JOG, G.J., SUGA, H., THOMASHOE, L.S., FARRAND, S.K. Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-hexanoil)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a cis-acting *phz* box. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n.18, p. 6517-6527, 2005.

KJAERGAARD, K., SCHEMBRI, M.A., RAMOS, C., MOLIN, S, KLEMM, P. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 2, p. 695-702, 2000.

KJELLEBERG, S., MOLIN, S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 254-258, 2002.

KOERSTGENS, V., FLEMMING, H.C., WINGENDER, J., BORCHARD, W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Water Science Technology**, v.43, p. 49-57. 2001.

LAUE, B.E., JIANG, Y., CHHABRA, S.R., JACOB, S., STEWART, G.S.A.B., HARDMAN, A., DOWNIE, J.A., O'GAARA, F., WILLIAMS, P. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. **Microbiology**, v.146, n.10, p.2469-2480, 2000.

LAW, B.A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 46, p. 573-588, 1979.

LIAO, C., MCCALLUS, D.E. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.3, p.914-921, 1998.

LYNCH, M. J., SWIFT, S., KIRKE, D.F, KEEVIL, W., DODD, C.E.R., WILLIAMS, P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 1, p.18-28, 2002.

LYNDSAY, D., BRÖZEL, V.S., MOSTERT, J.F., von HOLLY, A. Physiology of dairy - associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 49-62, 2000.

McCLEAN, K.H., WINSON, M.K., FISH, L., TAYLOR, A., CHABRA, S.R., CAMARA, M., DAYKIN, M., LAMB, J.H., SWIFT, S., BYCROFT, B.W., STEWART, G.S.A.B., WILLIAMS, P. *Quorum sensing and Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acyl homoserine lactones. **Microbiology**, v.143, p.3703–3711, 1997.

MACHADO, A.D.S. **Atividade proteolítica de *P. fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal**. 74 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: VANDERZANT, C., SPLITTSOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. APHA, cap.7, p.63-67, 2001.

OKADAK, E., TRAFNY, E. Secretion of protease by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n.8, p. 3281-3288, 2005.

O'TOOLE, G. A, KAPLAN, H.B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WSC365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 449-461, 1998.

OTT, C.M., DAY, D.F., KOENIG, D.W., PIERSON, D.L. The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. **Current Microbiology**, v.42, p 78-81, 2001.

PAPPAS, T., WINANS, S.C.A. LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. **Molecular Microbiology**, v. 48, p.1059–1073, 2003.

PARIZZI, S.Q.F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas**. 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

PIPER, K.R., VON BODMAN, S.B., FARRAND, S.K. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. **Nature**, v. 362, p.448–450, 1993.

PEARSON, J.P., PESCI, E.C., IGLEWSKI, B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* e *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 5756-5767, 1997.

PESCI, E.C., MILBANK, J.B., PEARSON, J.P., MCKNIGHT, S., DENDE, A.S., GREENBERG, E.P., IGLEWSKI, B.H. Quinolone 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.11229-11234, 1999.

PINTO, C.L.O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT**. 97p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

PINTO, U.M. **Quorum sensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite**. 70p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensm.-Wiss. u.-Technology**, v. 32, p. 321-326, 1999.

QIN, Y., LUO, Z. Q., SMYTH, A. J., GAO, P., VON BODMAN, B., S., FARRAND, S. K. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.19, n.19, p.5212–5221, 2000.

RAJMOHAN, S., DODD, C.E.R., WAITES, W.M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.205-213, 2002.

RAVN, L., CHRISTENSEN, A. B., MOLIN, S., GIVSKOV, M. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 239-251, 2001.

RICE, S. A., KOH, K.S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n.10, p. 3477-3485, 2005.

SAUER, K., CAMPER, A.K., EHRLICH, G.D., COSTERTON, J.W., DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v.184, p. 1140–1154, 2002.

SHAW, P.D., PING, G, DALY, S. L., CHA, C., CRONAN, J.E.J., RINEHART, K. L., FARRAND, S. K. Detecting and characterizing N-acyl homoserine lactone signal molecules by thin –layer chromatography. **Proceedings National Academy Science**, v. 94, p. 6036-6041, 1997.

SIMÕES, M., PEREIRA, M.O., VIEIRA, M.J. Effect of mechanical stress on biofilm challenged by different chemicals. **Water Research**, v. 39, p. 5142-5152, 2005.

SONG, B., LEFF, L.G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiological Research**, v. 161, p. 355-361, 2006.

SØRHAUG, T., STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-40, 1997.

STEINDER, L., VENTURI, L. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 2006. In press.

STEIDLE, A., ALLESEN-HOLM, M., RIEDEL, K., BERG, G., GIVSKOV, M., MOLIN, S., EBERL, L. Identification and characterization of a N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing system in *Pseudomonas putida* IsoF. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6371-6382, 2002.

STEMBERG, C., CHRISTENSEN, B.B., JOHANSEN, T., TOFTGAARD, N.A., ANDERSEN, J.B., GIVSKOV, M., MOLIN, S. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4108-4117, 1999.

TEMPÉ, J., PETIT, A., HOLSTERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. Thermosensitive step associated with transfer of Ti plasmid during conjugation: possible relation to transformation in crown gall. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p.2848-2849, 1977.

VAN HOUT, R., AERSTSEN, A. JANSSEN, A., QUINTANA, A.L., MICHIELS, C.W. Biofilm formation and cell-to-cell signaling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 177-184, 2004.

VANNINI, A., VOLPARI, C., GARGIOLI, C., MURAGLIA, E., CORTESE, R., DE FRANCESCO, R., NEDDERMANN, P., MARCO, S. D. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 21, p. 4393-4401, 2002.

WEBB, J. S. GIVSKOV, M., KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 578-585, 2003.

WHAN, L., DUNSTALL, G., ROWE, M.T. A study of the growth kinetics of two pseudomonads from pasteurized milk and the possible role of *quorum sensing*. **Milchwissenschaft**, v.55, p.371-373, 2000.

WHITELEY, M., BROWN, E., McLEAN, R.J.C. An inexpensive chemostat apparatus for the study of microbial biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, p. 125-132, 1997.

WIMPENNY, J.W.T., COLASANTI, R. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms for the structure of microbial biofilms base don cellular automation models. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p.1-16, 1997.

WINSON, M.K., SWIFT, S., FISH, L., THROUP, J.P., JØRGENSEN, F., CHABRA, S.R., BYCROFT, B.W., WILLIAMS, P., STEWART, G.S.A.B. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated *quorum sensing*. **FEMS Microbiology Letters**, v.163, p.85-192, 1998.

ZHANG, R.G., PAPPAS, T., BRACE, J.L., MILLER, P.C., OULMASOV, T., MOLYNEAUX, J.M., ANDERSON, J.C., BASHKIN, J.K., WINANS, S.C., JOACHIMIAK, A. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. **Nature**, v. 417, p. 971–974, 2002.

ZHU, J., BEARER, J.W., MORE, M.I., FUQUA, C., EBERHARD, A., WINANS, S. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.20, p.5398-5405, 1998.

ZHU, J., CHAI, Y., ZHONG, Z., LI, S., WINANS, S.C. *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of n-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6949-6953, 2003.

ZHU, J., WINANS, S.C. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 4832–4837, 1999.

ZHU, J., WINANS, S.C. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 1507–1512, 2001.

## CAPÍTULO 3

### DETECÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM* *SENSING* EM BIOFILMES FORMADOS POR *Hafnia alvei* e *Aeromonas hydrophila*

#### 3.1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos psicrotróficos tornaram-se uma preocupação para a indústria de laticínios, em decorrência da adoção da prática de refrigeração do leite na fonte de produção, da redução da frequência da coleta do produto e sua posterior estocagem na indústria (COUSIN, 1982). Quanto maior o tempo de armazenamento do leite à baixa temperatura antes do processamento, maiores serão as chances de aumentar a população de psicrotróficos (MURPHY E BOOR, 2000). As bactérias psicrotróficas são capazes de crescer em temperaturas inferiores a 7 °C, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (MUNSCH-ALATOSSAVA, 2006). A qualidade dos produtos lácteos pode ser afetada pela atividade de enzimas termorresistentes, como proteases e lipases extracelulares, produzidas por psicrotróficos antes e após o processamento térmico (FRANK, 1997; SØRHAUG E STEPANIAK, 1997). A detecção e o controle de psicrotróficos e de suas enzimas resistentes ao calor são de grande interesse para o controle de qualidade na indústria de produtos lácteos (SØRHAUG E STEPANIAK, 1997).

No primeiro dia de refrigeração, cinquenta por cento da microbiota psicrotrófica do leite cru pertence ao gênero *Pseudomonas*, sendo *Pseudomonas fluorescens* a espécie predominante (THOMAS e THOMAS, 1973). Outros psicrotróficos que podem ser encontrados no leite cru refrigerado são representados principalmente por bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp. e por bactérias Gram-positivas como *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Micrococcus* spp. (COUSIN, 1982; SØRHAUG e STEPANIAK, 1991; SHAH, 1994; PINTO 2004). Espécies de enterobactérias como *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* e *Serratia liquefaciens* podem também estar presentes (DESMASURES, 1995; PINTO, 2004).

Muitas bactérias Gram-negativas utilizam homoserinas lactonas aciladas (AHLs) para regular a expressão de seus genes por meio do sistema *quorum sensing* (QS) (FUQUA et al., 1994; WHITEHEAD et al., 2001). A detecção de AHLs produzidas por 45 das 53 bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite, incluindo estirpes de *P. fluorescens*, *H. alvei* e *Aeromonas hydrophila*, demonstrou que essas moléculas são comumente produzidas por essas espécies (PINTO et al., 2006) e, portanto, podem desempenhar funções importantes na regulação de diferentes fenótipos, incluindo a formação de biofilmes.

*H. alvei* compreende um grupo heterogêneo de bastonetes Gram-negativos, móveis, com flagelos peritríquios pertencente à família das *Enterobacteriaceae* (SAKAZAKI E TAMURA, 1992). Embora essa espécie seja capaz de formar biofilmes (JACK et al., 1992) e de produzir AHLs (GRAM et al., 1999; RAVN et al., 2001; BRUHN et al., 2004), não foram encontrados na literatura estudos que relacionem a formação dessas estruturas com o sistema QS. *A. hydrophila* é um patógeno oportunista Gram-negativo (JANDA e ABBOT, 1998) capaz de formar biofilmes em superfícies como silicone (WHITELEY et al., 1997) e aço inoxidável (BAL'A, 1998; LYNCH et al., 2002). Essa espécie produz C4-HSL e HHL por meio do homólogo de LuxI, AhyI, em proporção de 70:1 (SWIFT et al., 1997). O mutante *ahyI*, não-produtor de C4-HSL, foi incapaz de formar biofilme maduro, mas essa capacidade foi restaurada pela adição dessa AHL sintética ao substrato de crescimento (LYNCH et al., 2002).

Considerando que bactérias Gram-negativas são as mais frequentemente encontradas como contaminantes de leite cru granelizado e refrigerado e muitas são

capazes de formar biofilmes com conseqüente contaminação dos produtos processados, medidas preventivas e de controle dos biofilmes são necessárias. Essas medidas incluem a seleção adequada de detergentes e sanificantes, associada a métodos físicos de remoção, *layout* e desenho adequado dos equipamentos e escolha de materiais apropriados (KUMAR e ANAND, 1998). Entretanto, essas técnicas nem sempre são eficazes. Outra alternativa seria o controle de biofilmes pela interferência no sistema de *quorum sensing* (QS), em situações em que esse mecanismo de comunicação regule a formação de biofilmes. Estratégias propostas para controlar diversos fenótipos bacterianos por meio da interferência com o sistema de comunicação QS incluem (1) a inibição da biossíntese da molécula sinal (PARSEK et al., 1999); (2) a inativação química de sinais de QS por meio de antimicrobianos halogenados oxidantes (BORCHARDT et al., 2001; SUMMERFELT et al., 2003); (3) biodegradação da molécula sinal por lactonases bacterianas e por acilases bacterianas ou eucarióticas (DONG et al., 2000; LIN et al., 2003; DONG et al., 2004); (4) o uso de agonistas de QS (MÄE et al., 2001) e (5) a aplicação de antagonistas de QS, incluindo as furanonas halogenadas de ocorrência natural e as sintéticas (MANEFIELD et al., 1999; MANEFIELD et al., 2000; RASMUSSEN et al., 2000; REVERCHON et al., 2002; SMITH et al., 2003);

Em ambientes marinhos, muitos organismos produzem compostos químicos de defesa para se protegerem da colonização microbiana, a exemplo da macroalga australiana *Delisea pulchra*, que produz um amplo espectro de furanonas, algumas das quais apresentam atividades biológicas interessantes (DE NYS, et al., 1995; MANEFIELD et al., 2002). Em algumas bactérias, as furanonas interferiram com o sistema QS, incluindo a inibição da formação de biofilme (HENTZER et al., 2002; AL-BATAINEH et al., 2006). O esclarecimento sobre a interferência do QS na formação de biofilmes é fundamental para a proposta de controle da formação dessas estruturas.

Este estudo objetivou avaliar a capacidade de formação de biofilmes por estirpes psicotróficas, detectar a presença de moléculas sinalizadoras nessas estruturas e avaliar o uso de furanonas na inibição de sua formação.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo

Foram utilizadas três estirpes de *H. alvei* (059, 067 e 071) e uma de *A. hydrophila* 099 isoladas de leite cru refrigerado (PINTO, 2004) para a obtenção dos biofilmes. *Serratia liquefaciens* MG1 e MG44 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Michael Givskov (Universidade Técnica da Dinamarca) e foram utilizadas como culturas de referência no ensaio de determinação da atividade proteolítica. O estoque das culturas foi feito em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), contendo 40 % de glicerol e congelado a  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Antes de cada experimento, as células foram reativadas por duas semeaduras consecutivas em caldo BHI com incubação a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 18 h.

As estirpes monitoras que detectam AHL foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) (peptona  $10\text{ g L}^{-1}$ , extrato de levedura  $5\text{ g L}^{-1}$ , NaCl  $5\text{ g L}^{-1}$ ) e, quando necessário, suplementado com os antibióticos apropriados: kanamicina a  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cultivo de *C. violaceum* CV026 e tetraciclina a  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cultivo de *E. coli* pSB403. A estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) foi cultivada em meio mínimo AT suplementado com tetraciclina, na concentração de  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  e kanamicina a  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As estirpes monitoras utilizadas para detecção de AHLs nos biofilmes e para a biorevelação da cromatografia em camada delgada (CCD) foram *Chromobacterium*

*violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47(pCF218)(pCF372) e *Escherichia coli* pSB403.

Os fenótipos das estirpes monitoras utilizadas e as moléculas por elas detectadas estão listadas na Tabela 1 do Capítulo 2.

### **3.2.2. Crescimento e atividade proteolítica de bactérias psicotróficas**

As culturas de *H. alvei* 067 e 071, *A. hydrophila* 099 e *P. fluorescens* 097 foram ativadas em 10 mL de caldo BHI, por 24 h. As estirpes *S. liquefaciens* MG1 e MG44 também foram ativadas no mesmo meio e foram utilizadas como controle positivo e negativo para validar a metodologia da atividade proteolítica, visto que a estirpe mutante MG44 obtida a partir da MG1 apresenta menor atividade proteolítica, segundo descrições da literatura (GIVSKOV et al., 1997; RIEDEL et al., 2001). Inoculou-se 150 mL de LDR a 12 % com 1,5 mL de cada cultura e incubou-se a 26 °C. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 16, 24, 40, 48 e 72 h para determinação do número de células viáveis em Ágar Padrão para Contagem (PCA) pela técnica de microgotas e da atividade proteolítica, conforme descrito no item 2.3 do Capítulo 2.

A atividade proteolítica foi também avaliada em PCA suplementado com 0,75% de LDR, observando-se a formação de halo de clarificação da caseína (RAJMOHAN et al., 2002).

### **3.2.3. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável**

A formação dos biofilmes das estirpes *H. alvei* 067, 071 e *A. hydrophila* 099 em cupons de aço inoxidável imersos em MMS foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 2.6 do Capítulo 2. Para realizar as observações em microscópio de epifluorescência, os cupons foram submetidos aos tratamentos descritos no item 2.6.2 do Capítulo 2.

### **3.2.4. Efeito da adição de ativadores e de inibidores de *quorum sensing* na formação de biofilme**

Para estudar o efeito de homoserinas lactonas aciladas e de furanonas sintéticas no crescimento e na formação de biofilme de *H. alvei* 059, 071 e *A. hydrophila* 099, realizou-se o mesmo procedimento descrito no item 2.9 do Capítulo 2, utilizando-se o meio MMS.

O crescimento de *H. alvei* 059 e 071 foi avaliado também em MMS utilizando-se N-hexanoil-DL-homoserina lactona e N-dodecanoil-DL-homoserina lactona como única fonte de carbono. Para esse ensaio, as estirpes foram previamente ativadas em 5 mL de caldo BHI por 18 h e centrifugadas a 3.000 g em centrífuga Sorvall RT 6000D (DUPONT, EUA) por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de MMS e novamente centrifugadas na mesma velocidade e tempo. As células foram inoculadas em 3 mL de MMS e incubadas a 28 °C. O crescimento foi monitorado por densidade óptica em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (ThermoElectron Corporation, Madison WI, EUA) a 600 nm por até 48 h. A análise estatística dos dados foi realizada como descrito no item 2.9 do Capítulo 2.

### **3.2.5. Detecção de moléculas sinalizadoras nos biofilmes formados por *H. alvei***

Biofilmes de *H. alvei* 059, 067 e 071 foram formados em cupons de aço inoxidável imersos em MMS por 24 h, conforme descrito no item 2.6, Capítulo 2, modificando-se o inóculo inicial para densidade óptica maior que 1,0. Após o período de incubação, três cupons foram removidos, lavados em 20 mL de solução salina a 0,85 % esterilizada, colocados em placas de Petri esterilizadas e cada lado do cupom foi exposto à luz ultravioleta (312 nm), a 52 cm de distância, por 30 min. Realizou-se o ensaio da indução da produção do pigmento violaceína por *C. violaceum* CV026 e da indução da enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) de *A. tumefaciens* WCF47, conforme descrito no item 2.8, Capítulo 2. Para o ensaio de produção de violaceína, o ágar não foi suplementado com HHL. Para o ensaio de produção de bioluminescência por *E. coli* pSB403, utilizaram-se os mesmos procedimentos realizados nos ensaios descritos anteriormente, exceto pela suplementação do ágar LB com o antibiótico tetraciclina a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas

foram incubadas a 30 °C e os resultados foram observados por até 48 h. O resultado do ensaio de produção de bioluminescência foi monitorado em sala escura, a partir de 14 h de incubação, e as imagens foram capturadas no Eagle Eye II (STRATAGENE, La JOLLA, CA, EUA). Os mesmos ensaios foram realizados com cupons não-submetidos ao tratamento em luz ultravioleta. Como controle negativo dos experimentos, utilizaram-se cupons esterilizados sem formação de biofilme e, como controles positivos, os meios foram adicionados de 75 nmol L<sup>-1</sup> de HHL. A presença de AHL no biofilme foi indicada pela produção de violaceína por *C. violaceum* CV026 ou produção da enzima β-gal por *A. tumefaciens* WCF47, ou produção de bioluminescência por *E. coli* pSB403. Cada bioensaio foi realizado em, pelo menos, duas repetições independentes.

Um cupom contendo biofilme, exposto à luz ultravioleta em ambos os lados por 30 min, foi imerso em 10 mL de LB e incubado a 28 °C, por 24 h a fim de verificar o efeito do tratamento sobre a viabilidade das células.

### **3.2.6. Observação dos biofilmes em microscópio eletrônico de varredura**

Biofilmes de *H. alvei* 071 formados em cupons de poliestireno foram observados em microscópio eletrônico de varredura. Células de *H. alvei* 071 foram cultivadas em 10 mL de BHI, por 24 h. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 3.000 g por 10 min em centrífuga Sorvall RT 6000D (Dupont, EUA). O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com MMS, novamente centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de MMS, de forma a se obter uma densidade óptica maior que 1,0. Uma alíquota de 200 µL dessa suspensão foi inoculada nos orifícios de uma placa de poliestireno de 24 poços contendo MMS adicionado das substâncias-teste, de forma a se manter um volume final de 2 mL. Os tratamentos realizados foram: MMS suplementado com 200 µmol L<sup>-1</sup> de 2(5H)-furanona (F) ou 1 mol L<sup>-1</sup> de HHL. Como controles, utilizaram-se o MMS adicionado somente da suspensão de células e o MMS sem adição de células. Após a adição do inóculo, cupons de poliestireno medindo 1,0 x 1,2 cm foram mergulhados nos poços referentes a cada tratamento. Antes de serem imersos, os cupons foram previamente higienizados com água e detergente neutro, imersos em hipoclorito de sódio a 3 % por 30 min e submetidos à luz ultravioleta (312 nm), a 52 cm de

distância, por 30 min de cada lado. A incubação foi feita por 24, 48 e 72 h, sendo que a cada 24 h, três cupons foram removidos e submetidos às etapas de preparação para observação em microscópio eletrônico de varredura (Leo<sup>®</sup>, modelo VP 1430). Para isso, os cupons foram enxaguados em tampão PBS 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8 a 7,2) para remoção dos resíduos. A etapa de fixação consistiu do tratamento com glutaraldeído a 5 % e tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, na proporção de 1:1 por uma hora. Em seguida, foram realizadas seis lavagens de 10 min cada em tampão PBS a 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8 a 7,2). A etapa da desidratação consistiu de tratamentos seriados em etanol, nas graduações de 30 °, 50 °, 70 °, 80 °, 95 ° Gay Lussak-GL por 10 min cada e três tratamentos de 10 min em etanol 100 °GL. Os cupons foram transferidos para o secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer – CPD<sup>®</sup>, Bal Tec, modelo 30), para a desidratação total. Por último, foram metalizados em metalizador (Balzers<sup>®</sup>, modelo FDU 010) para posterior observação ao microscópio eletrônico de varredura e registro das imagens.

### **3.2.7. Detecção de AHLs nos extratos de células sésseis e planctônicas de *H. alvei***

Biofilmes de *H. alvei* 059, 067 e 071 foram formados em 15 cupons de aço inoxidável, por 24 h em meio MMS, conforme descrito no item 2.6 do Capítulo 2. Extratos de células sésseis e planctônicas foram obtidos conforme descrito no item 2.8 do Capítulo 2.

A presença de AHLs no extrato foi verificada no ensaio de indução da produção do pigmento violaceína pela estirpe monitora *C. violaceum* CV026. Adicionaram-se 25 µL do extrato a pocinhos de 3 mm de diâmetro feitos em ágar LB 1,2 %, adicionado dos antibióticos apropriados e previamente inoculado com, aproximadamente, 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> da estirpe monitora *C. violaceum* CV026. A formação de halo roxo ao redor do poço foi considerada resultado positivo para a presença de AHL de cadeia curta.

Realizou-se também o ensaio de indução da β-gal da estirpe *A. tumefaciens* WCF47, conforme descrito no item 2.8 do Capítulo 2.

Para o ensaio de indução de bioluminescência na estirpe *E. coli* pSB403, foram adicionados 25 µL dos extratos em pocinhos de 3 mm de diâmetro feitos em

ágar LB 0,9 %, suplementado com 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de tetraciclina e previamente inoculado com, aproximadamente,  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  da estirpe monitora. A formação de bioluminescência ao redor do poço, que foi monitorada em sala escura a partir de 14 h de incubação, foi considerada como resultado positivo. As imagens foram capturadas em equipamento Eagle Eye II<sup>®</sup> (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Como controle-positivo do ensaio, 25  $\mu\text{L}$  de HHL a 75  $\text{nmol L}^{-1}$  e, como controle-negativo, 25  $\mu\text{L}$  de extrato de MMS foram adicionados aos pocinhos.

Cada bioensaio foi realizado em duas repetições independentes.

### 3.2.8. Caracterização das homoserinas lactonas aciladas

As AHLs presentes nos extratos das culturas de *H. alvei* 059, 067 e 071 foram analisadas por cromatografia em camada delgada de fase reversa (CCD) em placas de alumínio (C18, RP, 254s, Merck) de 20 x 20 cm. Volumes de 10  $\mu\text{L}$  a 20  $\mu\text{L}$  dos extratos dos sobrenadantes livres de células sésseis e planctônicas (SLC) das estirpes avaliadas foram aplicados nas placas. Os extratos das células sésseis e planctônicas foram obtidos conforme descrito no item 2.8, Capítulo 2. Como padrões, foram utilizados  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona hidrobrometo, N-hexanoil-DL-homoserina lactona, N-decanoil-DL-homoserina lactona, N-dodecanoil-DL-homoserina lactona e N-tetradecanoil-DL-homoserina lactona (Fluka, Suíça). Os cromatogramas foram desenvolvidos no sistema de solvente metanol/água (60:40, vol/vol). Após o desenvolvimento, o solvente foi evaporado e as placas secas foram recobertas com a cultura da bactéria preparada como segue. Volumes de 30 mL das culturas de *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* estirpe WCF47 e *E. coli* pSB403 ativadas por 24 h foram usadas para inocular 150 mL de ágar LB 0,75 %. Para a revelação com *C. violaceum* CV026, o ágar LB foi suplementado com 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina e mantido a 45°C. Para a revelação com a estirpe *A. tumefaciens* WCF4, 150 mL do meio foi suplementado com 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de X-gal, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de tetraciclina e para a revelação com *E. coli* pSB403, o ágar LB foi suplementado com 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de tetraciclina. Após homogeneização, o meio LB inoculado com a cultura monitora foi espalhado sobre a superfície da placa de CCD de forma a se obter uma camada uniforme. A placa foi emoldurada com uma

proteção de fita crepe para impedir o derramamento do ágar. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 30 °C, por 16 a 24 h, em recipientes plásticos umidificados (SHAW et al., 1997; RAVN et al., 2001). O surgimento de manchas de coloração roxa nas placas reveladas com a estirpe *C. violaceum* CV026 foram considerados como positivas para a presença de AHLs. A presença de AHLs nas placas reveladas com a estirpe *A. tumefaciens* WCF47 foi considerada quando da observação de manchas de coloração azul, e nas reveladas com *E. coli* pSB403, o aparecimento de manchas luminescentes observadas no Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Os fatores de retardamento (*R<sub>f</sub>*) das amostras e dos padrões foram obtidos dividindo-se a distância percorrida pela amostra (centro da mancha) pela distância percorrida pelo solvente.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Crescimento e atividade proteolítica de isolados psicotróficos e de *S. liquefaciens*

As estirpes 067 e 071 de *H. alvei*, 099 de *A. hydrophila* e MG1 e MG44 de *S. liquefaciens* alcançaram população final de  $10^8$  e  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> após 16 h de incubação a 26 °C (Figura 1A) e apresentaram atividade proteolítica entre 0 e 50 unidades de enzimas proteolíticas h<sup>-1</sup> no período de 72 h de incubação (Figura 1B).

*S. liquefaciens* MG1 foi a estirpe que apresentou maior atividade proteolítica dentre as bactérias avaliadas e sua atividade foi detectada ao final da fase log de crescimento em LDR 12 %, enquanto as demais culturas produziram proteases na fase estacionária (Figura 1B). Estudos demonstram que a produção de proteases por bactérias ocorre ao final da fase exponencial e permanece ao longo da fase estacionária de crescimento (GRIFFITHS, 1989; RAJMOHAN et al., 2002; NICODÈME et al., 2005).

Atividade proteolítica nas estirpes *H. alvei* 067 e 071 em LDR 12 % não foi detectada, embora essas culturas tenham sido isoladas por Pinto (2004) como psicotróficas proteolíticas. De fato, quando cultivadas em PCA adicionado de 0,75 % de LDR, foi possível verificar a presença de pequeno halo de hidrólise da caseína ao redor das colônias dessas estirpes. É provável que o método de avaliação da atividade proteolítica usado, baseado na hidrólise da azocaseína, não tenha sido sensível o suficiente para detectar a baixa atividade proteolítica dessas

estirpes. Condições de cultivo influenciam a produção de proteases em muitas bactérias. A adição de 1 % de LDR em meio mínimo de sais aumentou a atividade proteolítica de *P. fluorescens* em, aproximadamente, 10 vezes (MACHADO, 2006).

A menor atividade proteolítica detectada com *S. liquefaciens* MG44 pode ser explicada por se tratar de uma estirpe mutante não-produtora de AHL (GIVSKOV et al., 1997; RIEDEL et al., 2001), uma vez que em *S. liquefaciens* MG1, o fenótipo proteolítico é regulado pelo sistema QS (GIVSKOV et al., 1997; RIEDEL et al., 2001).

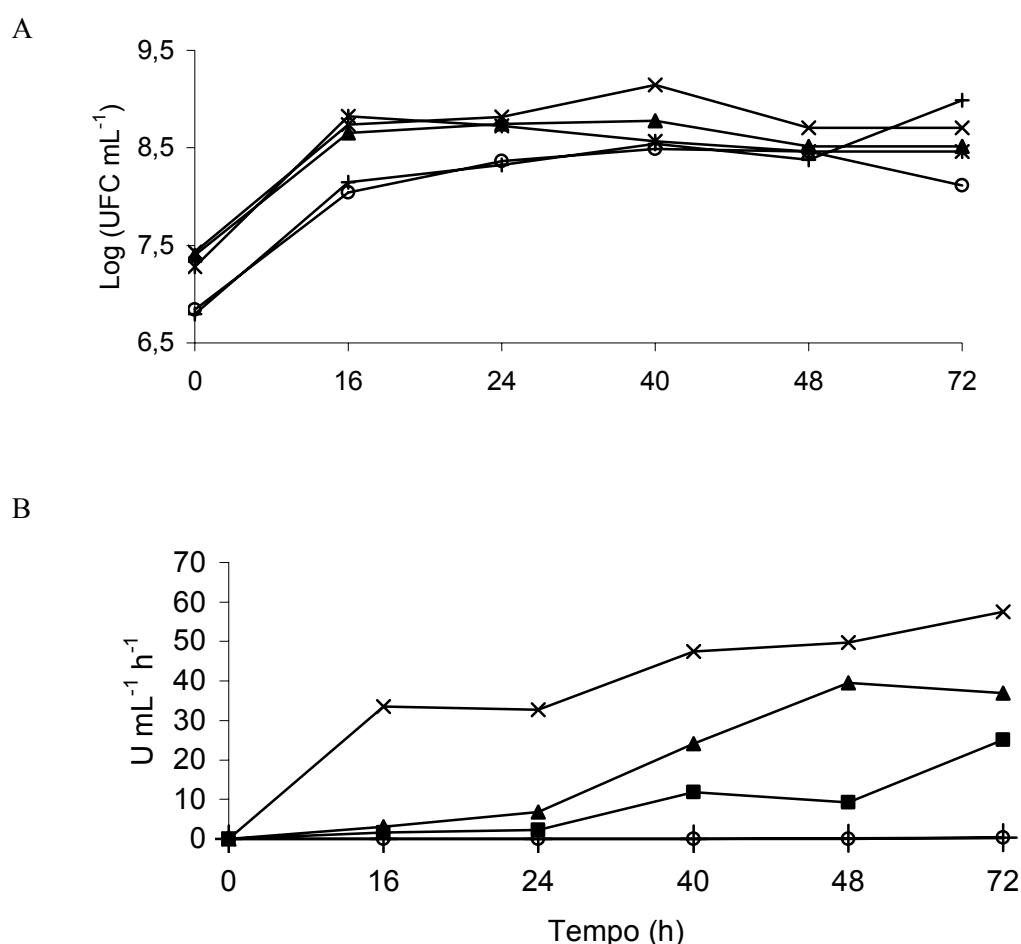


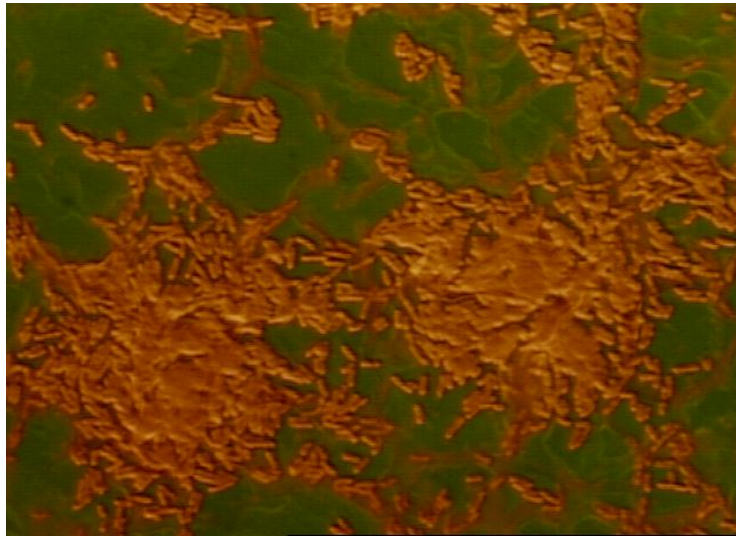
Figura 1 – Crescimento (A) e atividade proteolítica (B) das estirpes *Hafnia alvei* 067, *H. alvei* 071, *Aeromonas hydrophila* 099, *Serratia liquefaciens* MG1 e *Serratia liquefaciens* MG44 cultivadas em LDR 12 % a 26 °C, por 72 h. (o) *H. alvei* 067; (i) *H. alvei* 071; (▲) *A. hydrophila* 099; (X) *S. liquefaciens* MG1, (■) *S. liquefaciens* MG 44.

### 3.3.2. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável

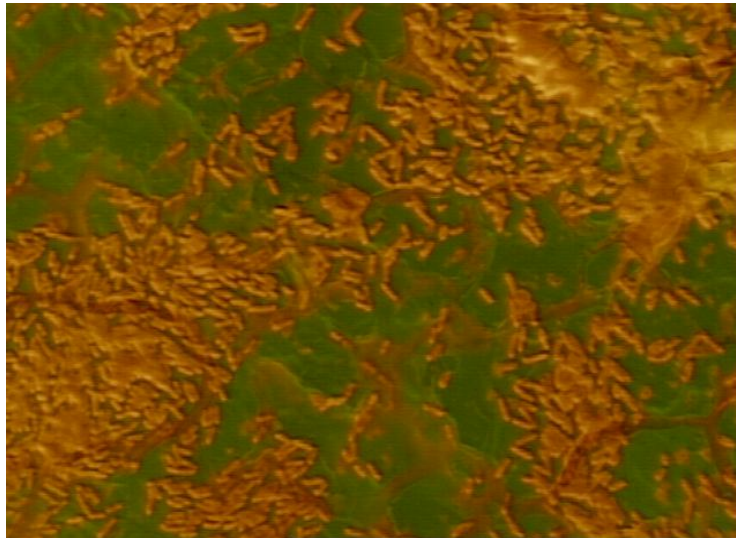
As microfotografias obtidas por microscopia de epifluorescência evidenciaram que as estirpes *H. alvei* 067, 071 e *A. hydrophila* 099 são capazes de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável (Figuras 2, 3 e 4). Durante as 96 h de acompanhamento da formação de biofilmes com observação em microscópio de epifluorescência, não foi detectada a formação de estruturas homogêneas ao longo de toda a superfície. Constatou-se a presença de regiões dos cupons de aço inoxidável com poucas células alternadas com regiões de densidade populacional elevada. Esses resultados indicaram que essas estirpes bacterianas apresentam potencial para colonizar superfícies. Se presentes nas superfícies de processamento de leite e equipamentos, esses deterioradores podem se desprender dos biofilmes e contaminar o leite cru e os produtos processados, resultando em perdas econômicas para a indústria de laticínios. Embora *H. alvei* seja encontrada como parte da microbiota deterioradora de vários alimentos (GRAM et al., 1999; RAVN et al., 2001; BRUHN et al., 2004; PINTO, 2004) e apresente potencial para formar biofilmes (JACK et al., 1992), não foram encontrados na literatura estudos sobre a formação de biofilmes por essa estirpe em superfícies que entram em contato com alimentos. Entretanto, *A. hydrophila* (JANDA e ABBOT, 1998) é capaz de formar biofilmes em superfícies como silicone (WHITELEY et al., 1997) e aço inoxidável (BAL'A, 1998; LYNCH et al., 2002).

Após 16 h de incubação, foi evidenciada a formação de multicamadas de células e de aglomerados celulares pela estirpe *H. alvei* 067 (Figura 2). Esses aglomerados permaneceram até o tempo final de observação, que foi de 96 h (Figura 2). Embora *H. alvei* 071 tenha apresentado menor número de células aderidas às 16 h de incubação, quando comparada com as outras estirpes avaliadas, foi observado que, após 24 e 72 h de incubação, houve formação de camadas de células em multiplanos, que permaneceram estáveis até o período final de incubação (Figura 3). A capacidade de adesão é variável entre as estirpes bacterianas. Fatores inerentes ao microrganismo como espécie, carga, hidrofobicidade, presença de apêndices superficiais como pili, fimbrias, flagelos, cápsula e capacidade de sintetizar substâncias exopoliméricas influenciam a formação dos biofilmes (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BOWER et al., 1996; CHMIELESWSKI e Frank, 2003).

16 h



48 h



96 h

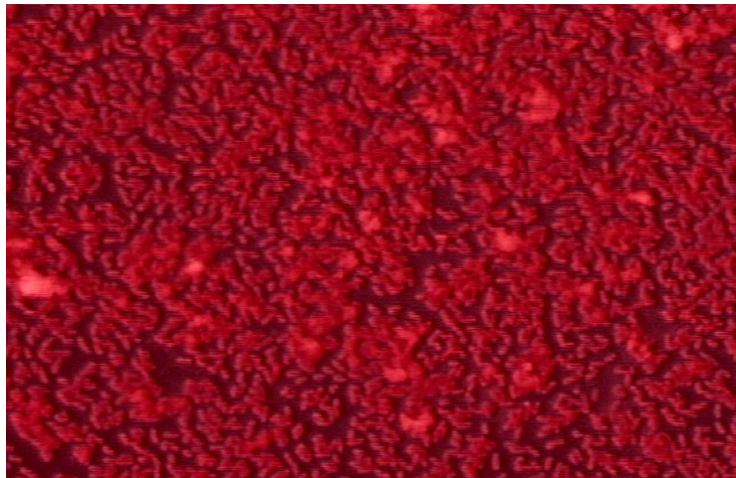
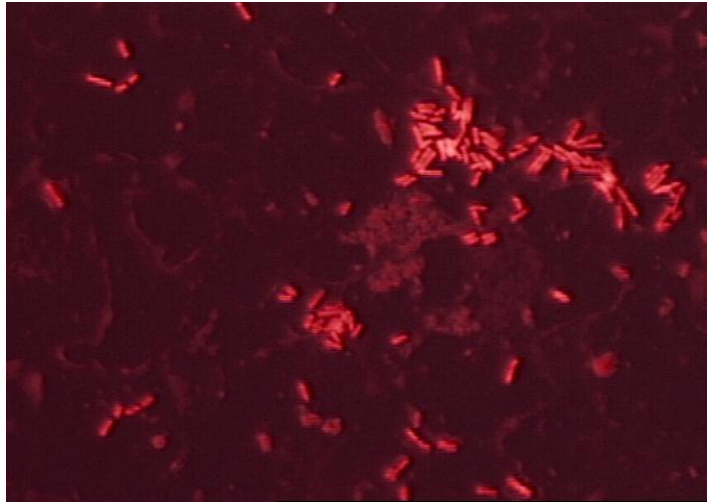
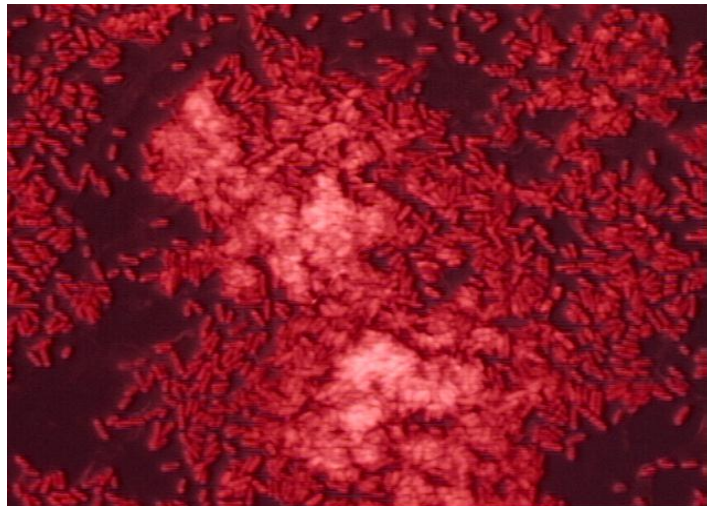


Figura 2 – Microfotografias de biofilmes formados por *H. alvei* 067 em cupons de aço inoxidável imersos em MMS, a 26 °C, no período de 0 a 96 h.

**16 h**



**24 h**



**72 h**

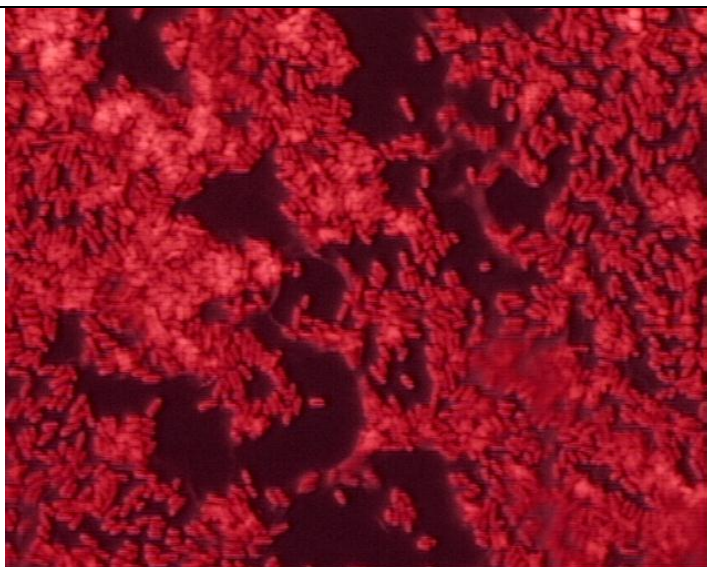
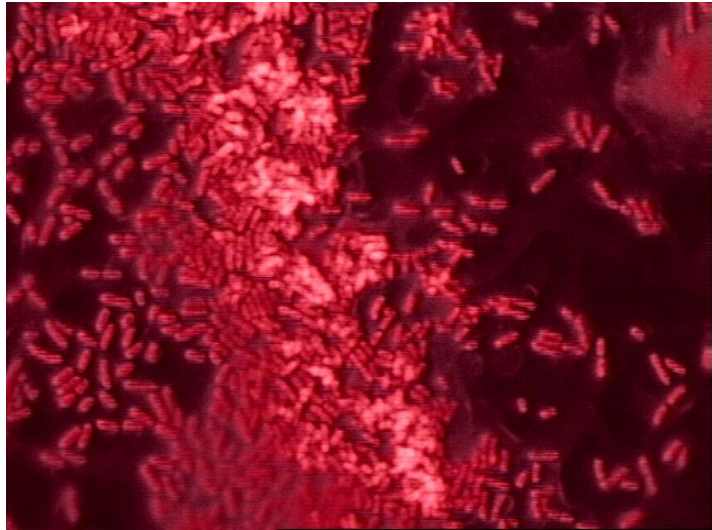
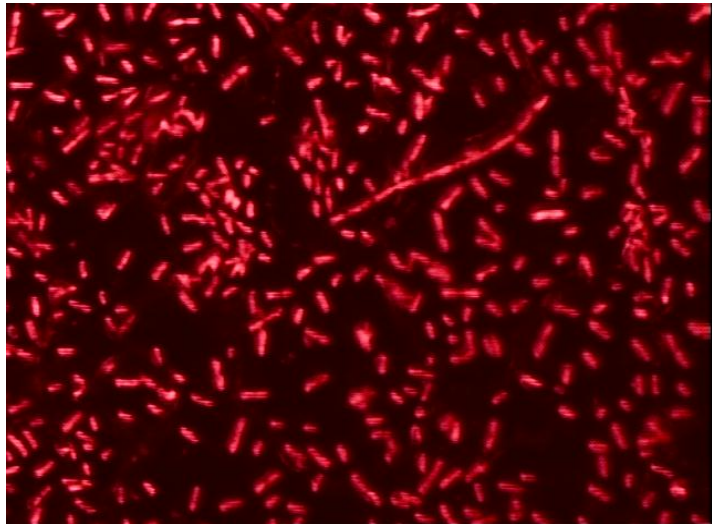


Figura 3 – Microfotografias de biofilmes formados por *H. alvei* 071 em cupons de aço inoxidável imersos em MMS, a 26 °C, no período de 16 a 72 h.

24 h



72 h



96 h



Figura 4 – Microfotografias de biofilmes formados por *A. hydrophila* 099 em cu-pons de aço inoxidável imersos em MMS, a 26 °C, no período de 0 a 120 h.

Cinco estirpes de *Burkholderia cepacia* apresentaram variação entre a capacidade de formar biofilmes em microplacas de poliestireno quando cultivadas por 48 h (CONWAY et al., 2002). A capacidade de adesão também foi variável em sessenta e oito isolados de uma linha de processamento de vegetais, com valores de densidade óptica entre 0,051 a 2,888 (VAN HOUDT et al., 2003). Machado (2006) constatou que a capacidade de desenvolvimento de biofilme foi variável entre estirpes de *P. fluorescens* isoladas de leite. Os resultados do estudo de Ghauri et al. (2006) também evidenciaram que estirpes de bactérias acidófilas da mesma espécie ou de espécies diferentes podem apresentar diferenças notáveis em sua capacidade de adesão em materiais sólidos.

*A. hydrophila* 099 apresentou potencial formador de biofilme a partir de 16 h de incubação (Figura 4). Com 24 h de cultivo, houve formação de biofilme espesso e alterações morfológicas nas células aderidas, como alongamento e formação de cadeias (Figura 4). Provavelmente, essas modificações na morfologia celular ocorreram como consequência de estados fisiológicos diferenciados entre as células que compõem o biofilme. A redução substancial do biofilme formado por *A. hydrophila* observada após 72 h de incubação (Figura 4) pode ter ocorrido como resultado de lise enzimática de células. Entretanto, com 96 h de incubação, o biofilme tornou-se compacto e com grande número de células formando aglomerados grandes. A formação dos biofilmes é um processo dinâmico e influenciado por fatores inerentes às condições de cultivo e às propriedades individuais dos microrganismos. Um decréscimo no número de células de *P. fluorescens* aderidas a cupons de aço inoxidável também foi observado em meio TSB e em TSB diluído (HOOD e ZOTTOLA, 1997). Segundo esses autores, esse decréscimo pode estar relacionado a mudanças no substrato, promovidas pela atividade metabólica das células, que modifica o ambiente e afeta a aderência celular. A ocorrência de hidrólise na matriz extracelular, pela ação de enzimas secretadas ou associadas à superfície celular, é um fator importante (PARSEK e FUQUA, 2004). A perda de exopolímeros em biofilmes de *P. fluorescens* B52, após 20 e 50 h de incubação, foi constatada por Allison et al. (1998), que observaram uma aceleração dessas perdas quando o cultivo foi realizado em sobrenadante de culturas de dois dias. Outros fatores a serem considerados na liberação das células do biofilme são: a concentração de nutrientes, a fase de crescimento celular, a disponibilidade de cátions multivalentes e a presença de moléculas sinalizadora de QS (HUNT et al., 2004).

### 3.3.3. Detecção de homoserinas lactonas aciladas em biofilmes formados por bactérias psicrotóficas isoladas de leite

Verificou-se que houve produção de AHL nos biofilmes formados por todas as estirpes avaliadas, sendo detectadas, pelo menos, por uma estirpe monitora (Tabela 1). A ausência de violaceína na cultura de *C. violaceum* CV026 indicou que são necessárias quantidades maiores de AHL para ativar essa estirpe. Estudos já realizados demonstraram que a estirpe monitora *C. violaceum* CV026 não detecta nenhuma AHL com substituição hidroxil na cadeia acilada e falta sensibilidade a muitos derivados oxo (McCLEAN et al., 1997; CHA et al., 1998). Por outro lado, *A. tumefaciens* WCF47 foi a estirpe monitora mais sensível às AHLs, sendo que a indução de  $\beta$ -gal ocorreu como resposta aos autoindutores produzidos por todas as bactérias avaliadas. *E. coli* pSB403 detectou produção de AHL apenas pelas estirpes *H. alvei* 067 e 071. Esses resultados reforçaram a necessidade de se utilizarem vários sistemas monitores para detecção de AHLs. Cada sistema monitor apresenta sensibilidade diferente e responde a grupos específicos de AHLs (ZHU et al., 2003).

Tabela 1 – Avaliação da produção de AHL em biofilmes formados por *H. alvei* e *A. hydrophila* em cupons de aço inoxidável imersos em MMS e incubados a 26 °C, por 24 h. Os cupons foram tratados ou não com radiação ultravioleta

Bactérias avaliadas	(1) CV026 (Indução e Inibição)		(2) WCF47		(3) pSB403	
	UV (30 min)	Sem UV	UV (30 min)	Sem UV	UV (30 min)	Sem UV
<i>H. alvei</i> 059	-	-	++	+++	-	-
<i>H. alvei</i> 067	-	-	++	+++	+	+++
<i>H. alvei</i> 071	-	-	++	+++	++	+++
<i>A. hydrophila</i> 099	-	-	++	+++	-	-

Estirpes monitoras: (1) *C. violaceum* CV026, (2) *A. tumefaciens* WCF47, (3) *E. coli* pSB403. Intensidade do sinal: (-) ausente, (+) baixa, (++) média, (+++) alta.

As estirpes monitoras que responderam positivamente às AHLs apresentaram resposta mais evidente quando os biofilmes não foram expostos à luz ultravioleta,

como pode ser verificado com o isolado *H. alvei* 071 (Figura 5). Esse resultado pode ser explicado pela transferência das células viáveis do biofilme para o ágar, com conseqüente crescimento e produção de AHL no meio de cultivo. Outra explicação seria a degradação das AHLs presentes no biofilme pela exposição à luz ultravioleta, ocasionando uma resposta menos intensa. Verificou-se que a exposição à luz ultravioleta foi efetiva para eliminar a maioria das células presentes. A imersão de um cupom contendo biofilme previamente exposto à luz ultravioleta em caldo LB, com subseqüente incubação a 28 °C, resultou na turvação do meio somente após 24 h de incubação, tempo suficiente para a observação dos resultados de detecção de AHL *in situ*. A constatação de que células do biofilme produzem AHLs sugere que o QS desempenha alguma função na regulação da formação dessas estruturas nas estirpes avaliadas.

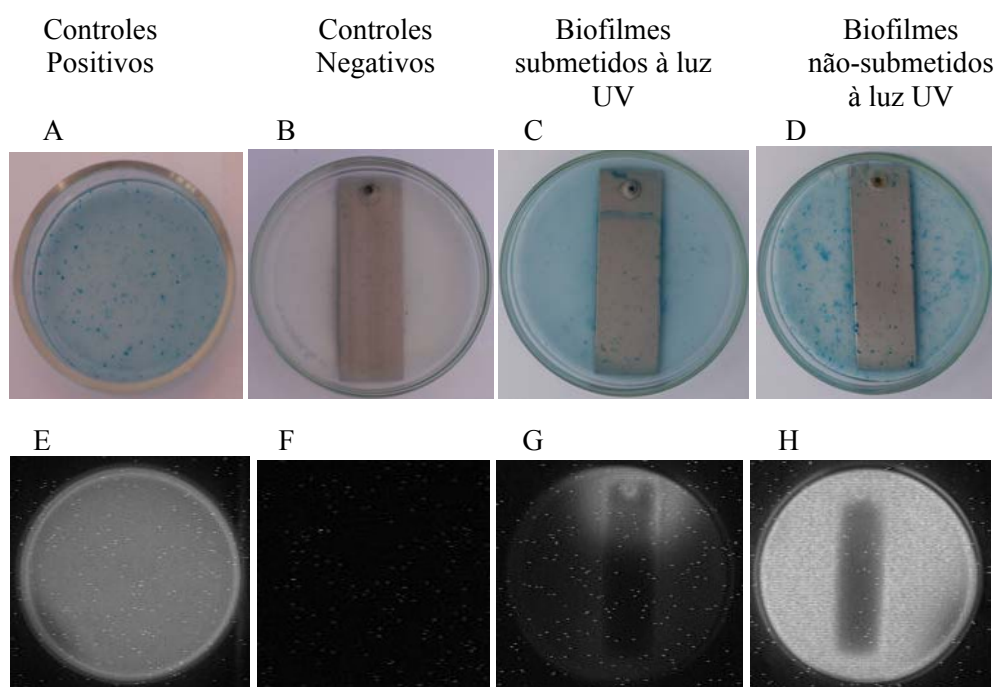


Figura 5 – Detecção de N-acil-homoserinas lactonas em biofilmes formados por *H. alvei* 071 em MMS, a 26 °C, durante 24 h utilizando-se as estirpes monitoras *A. tumefaciens* WCF47 (A a D) e *E. coli* pSB403 (E a H).

Existem vários trabalhos na literatura referentes à regulação da formação de biofilmes pelo sistema QS em diversas espécies bacterianas. O uso de bactérias

biosensoras sugere que as AHLs são produzidas por bactérias em biofilmes oriundos de ambientes naturais (McLEAN et al., 1997) e de laboratório (ALLISON et al., 1998; DAVIES et al., 1998; CHARLTSTON et al., 2000; BALLESTRINO et al., 2005; RICE e KOH, 2005). Acil homoserinas lactonas foram encontradas em biofilmes aquáticos formados em pedras submersas e também em extratos desses biofilmes, empregando-se a estirpe monitora *A. tumefaciens* A136 (McLEAN et al., 1997). A adição de sobrenadante da cultura de *P. fluorescens* B52 de dois dias e de HHL ao meio de crescimento aumentou a formação de biofilme por essa estirpe (ALLISON et al., 1998). Estudos *in vitro* comprovaram que a molécula sinalizadora N-oxo-C<sub>12</sub>-HSL está envolvida na formação de biofilme por *P. aeruginosa* (DAVIES et al., 1998). Nesse estudo, o mutante *lasI* formou biofilme plano, não-diferenciado, distinto do formado pela estirpe selvagem. Quando adicionados da molécula-sinal sintética, os mutantes recuperaram a capacidade de expressar o fenótipo da estirpe selvagem. A molécula-sinal N-3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL foi acumulada nos biofilmes de *P. aeruginosa* em concentração 4,5 vezes maior do que a encontrada na fase planctônica (CHARLTSTON et al., 2000). Em estudos com células planctônicas de *P. aeruginosa* foi constatado que AHLs com cadeias laterais de quatro (PEARSON et al., 1999) e seis carbonos (KAPLAN e GREENBERG, 1985) estavam distribuídas igualmente nos espaços intra e extracelular. Contrariamente, as AHLs de cadeias longas concentraram-se três vezes mais no interior da célula (PEARSON et al., 1999).

Para determinar a dependência do gene *luxS* de *Klebsiella pneumoniae* no processo de colonização, foi construído um mutante *luxS* e sua capacidade de colonização foi testada em superfície biótica e abiótica. Análises microscópicas da estrutura dos biofilmes revelaram que o mutante *luxS* formou biofilme maduro, porém com microcolônias reduzidas (BALLESTRINO et al., 2005). A formação de biofilmes por *S. marcescens* é controlada pelo QS e por condições nutricionais (RICE e KOH, 2005). Sob condições limitantes de carbono e nitrogênio, *S. marcescens* forma um biofilme clássico, constituído por microcolônias. Porém, quando o meio pobre é substituído por meio complexo, o biofilme torna-se filamentoso. Em condições onde o meio é rico, mutantes incapazes de sintetizar AHLs formam biofilmes indistinguíveis dos formados pela estirpe selvagem.

### 3.3.4. Determinação da produção de AHL por células sésseis e planctônicas de *H. alvei*

*H. alvei* 071 foi escolhida para a realização desse ensaio por ter sido a estirpe que induziu respostas mais intensas nas monitoras *E. coli* pSB403 e *A. tumefaciens* WCF47 (Tabela 1). O extrato de AHL obtido a partir das células planctônicas cultivadas em MMS induziu as três estirpes monitoras avaliadas (Figura 6). Entretanto, quando a extração foi feita a partir da suspensão de células removidas do biofilme formado em aço inoxidável, observou-se resposta positiva com as monitoras *E. coli* pSB403 e *A. tumefaciens* WCF47, porém menos intensa do que a detectada com o extrato de células planctônicas.

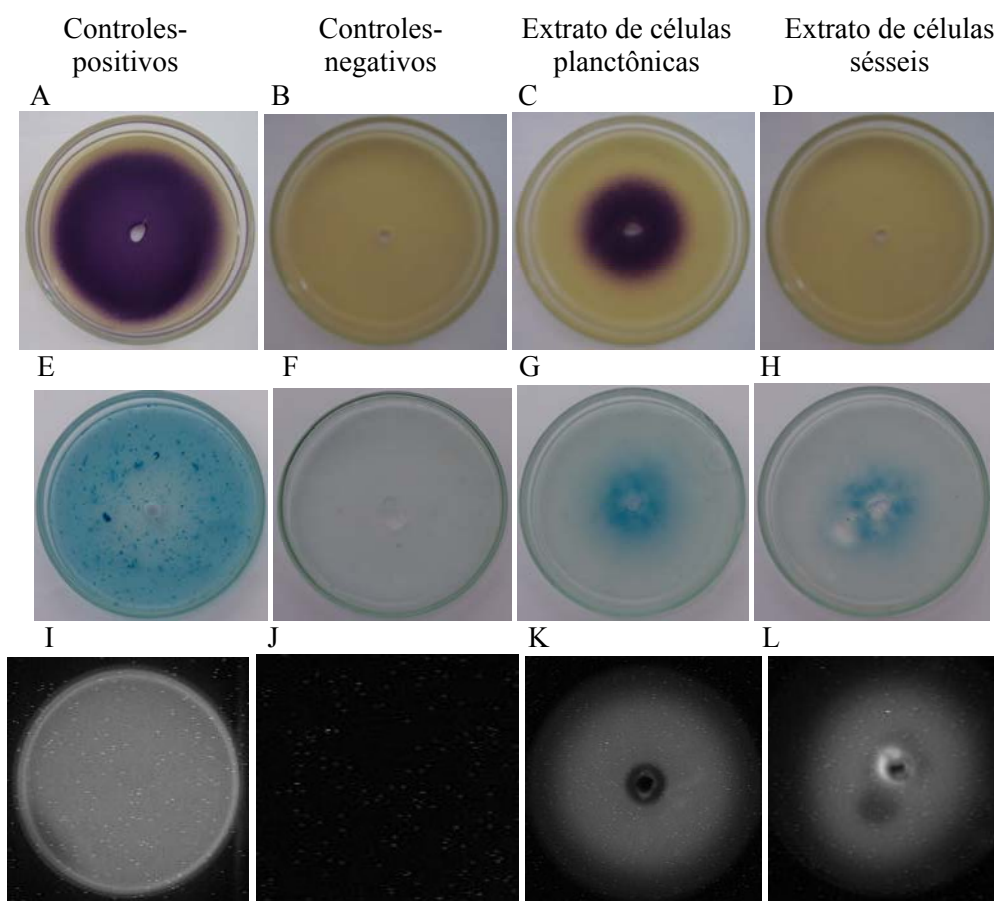


Figura 6 – Detecção de AHLs produzidas pelas células sésseis e planctônicas de *H. alvei* 071 utilizando-se as estirpes monitoras *C. violaceum* CV026 (A a D); *A. tumefaciens* WCF47 (E a H) e *E. coli* pSB403 (I a L).

A ausência de produção de violaceína por *C. violaceum* CV026 (Figura 6D) é indício de que essa estirpe requer concentrações mais elevadas de AHL para ativação de seu sistema monitor ou ainda a ocorrência de produção de AHL incapaz de induzir *C. violaceum* por células em biofilme.

Os dados obtidos nesse ensaio estão de acordo com os obtidos anteriormente (item 3.3), e indicam uma possível regulação da formação de biofilmes de *H. alvei* 071 pelo sistema QS. A indução de resposta menos intensa nos monitores pelos extratos das células sésseis em relação aos de células planctônicas pode ser em razão de a extração ter sido realizada a partir de menor concentração celular. Outras possíveis explicações seriam que células sésseis produzem menos AHL ou a liberação de parte das AHLs produzidas no biofilme para o meio de cultivo. Não foram encontrados na literatura trabalhos que relacionam a formação de biofilmes por *H. alvei* com o sistema QS. Entretanto, essa espécie bacteriana é reconhecidamente produtora de AHL. Trinta e sete isolados de *H. alvei* provenientes de carne embalada a vácuo ativaram as monitoras *E. coli* pSB4043 e *C. violaceum* CV026 (GRAM et al., 1999). Todas as 36 estirpes de *H. alvei* isoladas de alimentos também foram positivas para a produção de AHL quando estriadas em paralelo às estirpes monitoras *A. tumefaciens* A136, *E. coli* pSB403 e *C. violaceum* CV026 no ensaio de indução de violaceína produzindo, possivelmente, as moléculas C4-HSL, HHL, C8-HSL e oxo-C8-HSL (RAVN et al., 2001). Pinto et al. (2006) avaliaram três estirpes de *H. alvei* isoladas de leite quanto à produção de AHL e encontraram resultado positivo ao utilizarem as estirpes monitoras *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403.

### **3.3.5. Efeito da adição de inibidores e de ativadores de QS no crescimento e na formação de biofilme**

A adição de 3-metil-2(5H) furanona (MF), (2) 2-metiltetrahydro furan-3-ona (MTHF), (3) 2(5H)-furanona (F) ao MMS, exerceu efeito inibitório significativo ( $P < 0,05$ ) no crescimento de *H. alvei* 059 (Figura 7A), enquanto a adição de AHLs não afetou o crescimento ( $P > 0,05$ ) (Figura 7B). Nas concentrações avaliadas, as AHLs não foram utilizadas como fonte de carbono por *H. alvei* 059 o que indicou que valores maiores de densidades ópticas obtidas em presença de AHLs não resultaram do uso dessa molécula como fonte adicional de carbono.

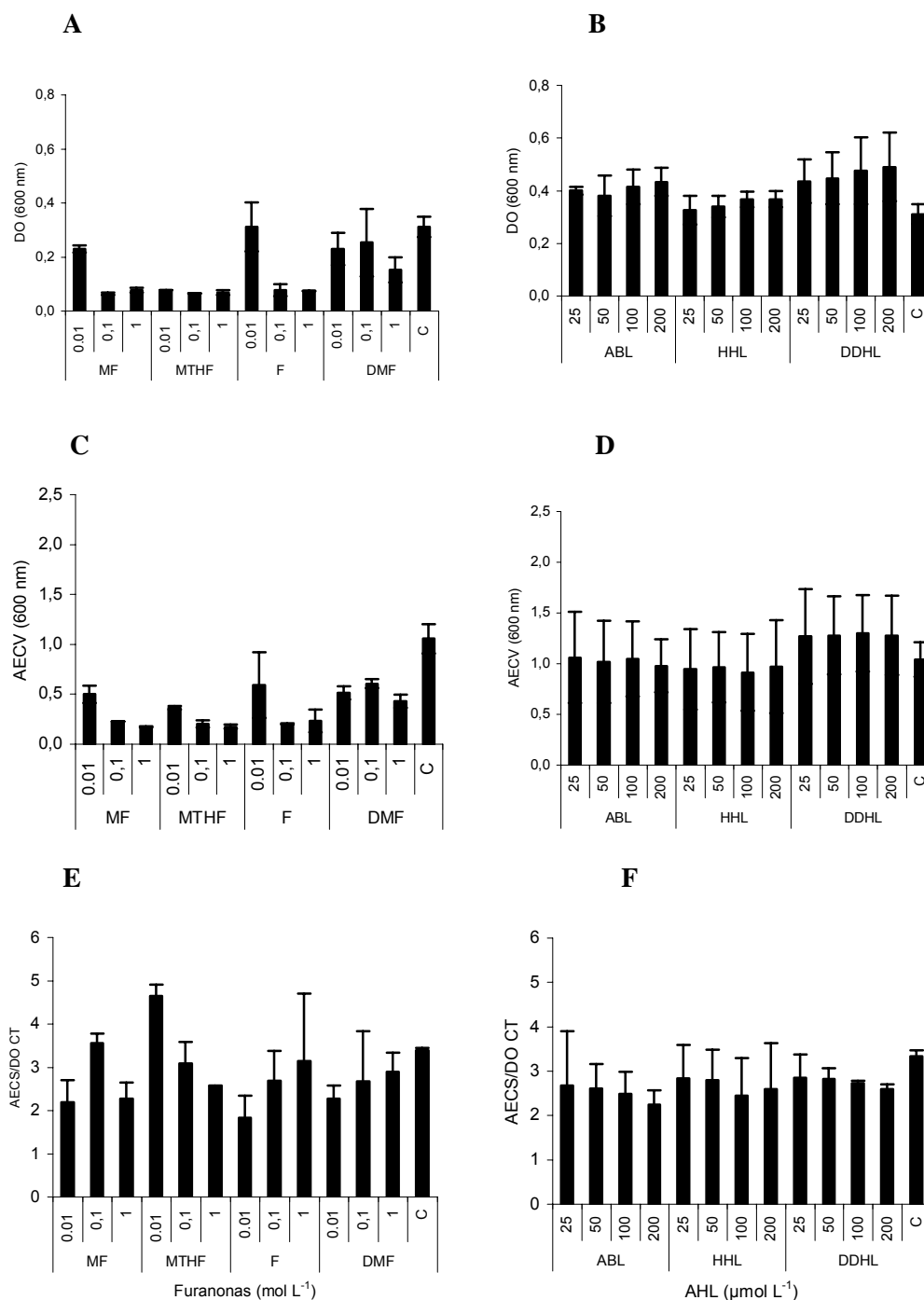


Figura 7 – Crescimento (A e B), formação de biofilme (C e D) e razão entre a absorvância do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais (E e F) de *H. alvei* 059 em MMS após 24 h de incubação. MMS adicionado de: 3-metil-2(5H)-furanona (MF); metiltetrahydrofuranona (MTHF); 2(5H)-furanona (F); 2,2-dimetil-3(2H)-furanona (DMF) nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup> e de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL), α-amino-δ-butirolactona (ABL) e N-dodecanoil-DL-homoserina lactona (DDHL) nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μmol L<sup>-1</sup>; (C) Controle; (AECV) absorvância do extrato do cristal violeta; (CT) células totais.

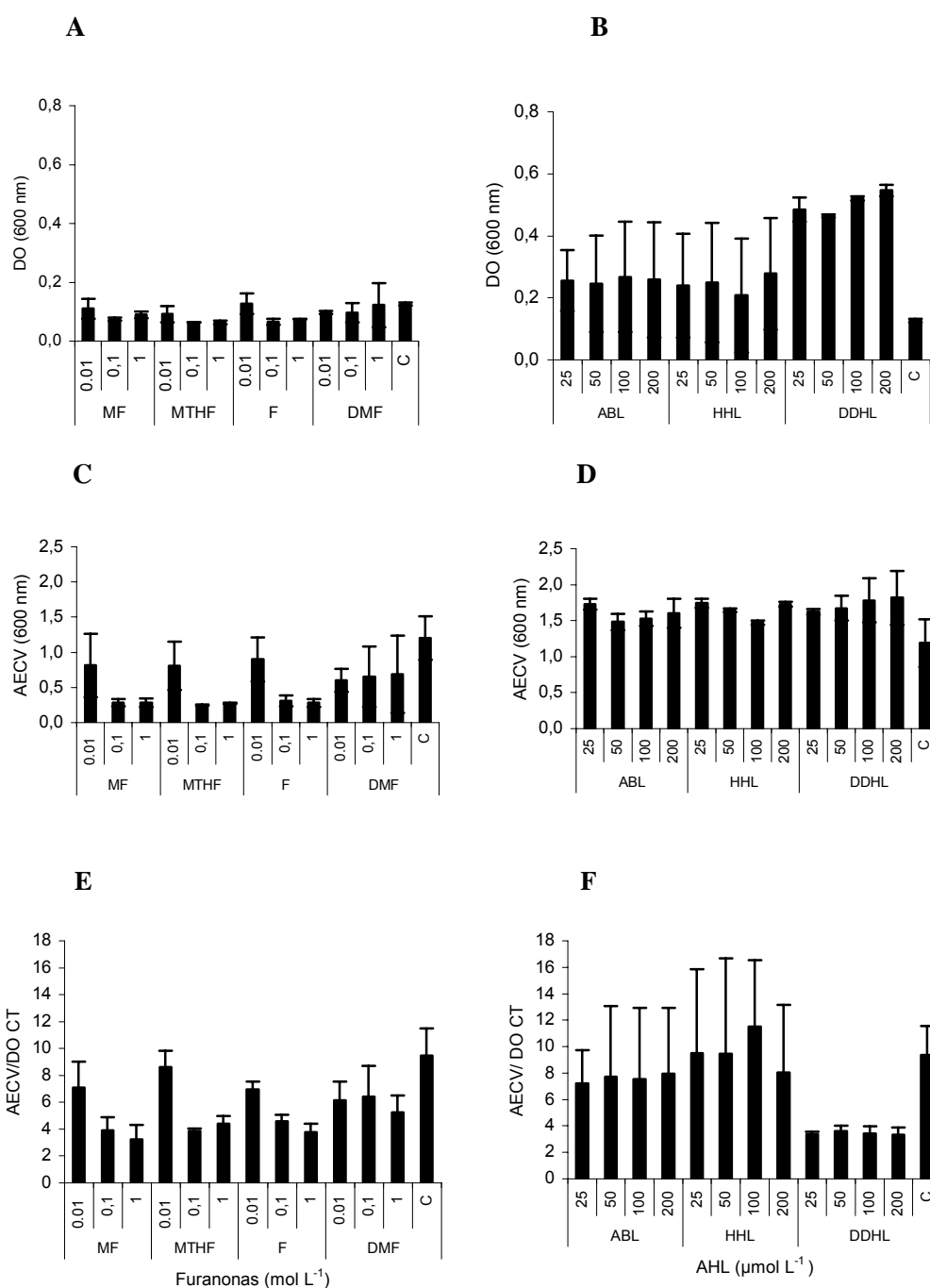


Figura 8 – Crescimento (A e B), formação de biofilme (C e D) e razão entre a absorvância do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais (E e F) de *H. alvei* 071 em MMS após 24 h de incubação. MMS adicionado de: 3-metil-2(5H)-furanona (MF); metiltetrahydrofuranona (MTHF); 2(5H)-furanona (F); 2,2-dimetil-3(2H)-furanona (DMF) nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup> e de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL), α-amino-δ-butirolactona (ABL) e N-dodecanoil-DL-homoserina lactona (DDHL) nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μmol L<sup>-1</sup>; (C) Controle; (AECV) absorvância do extrato do cristal violeta; (CT) células totais.

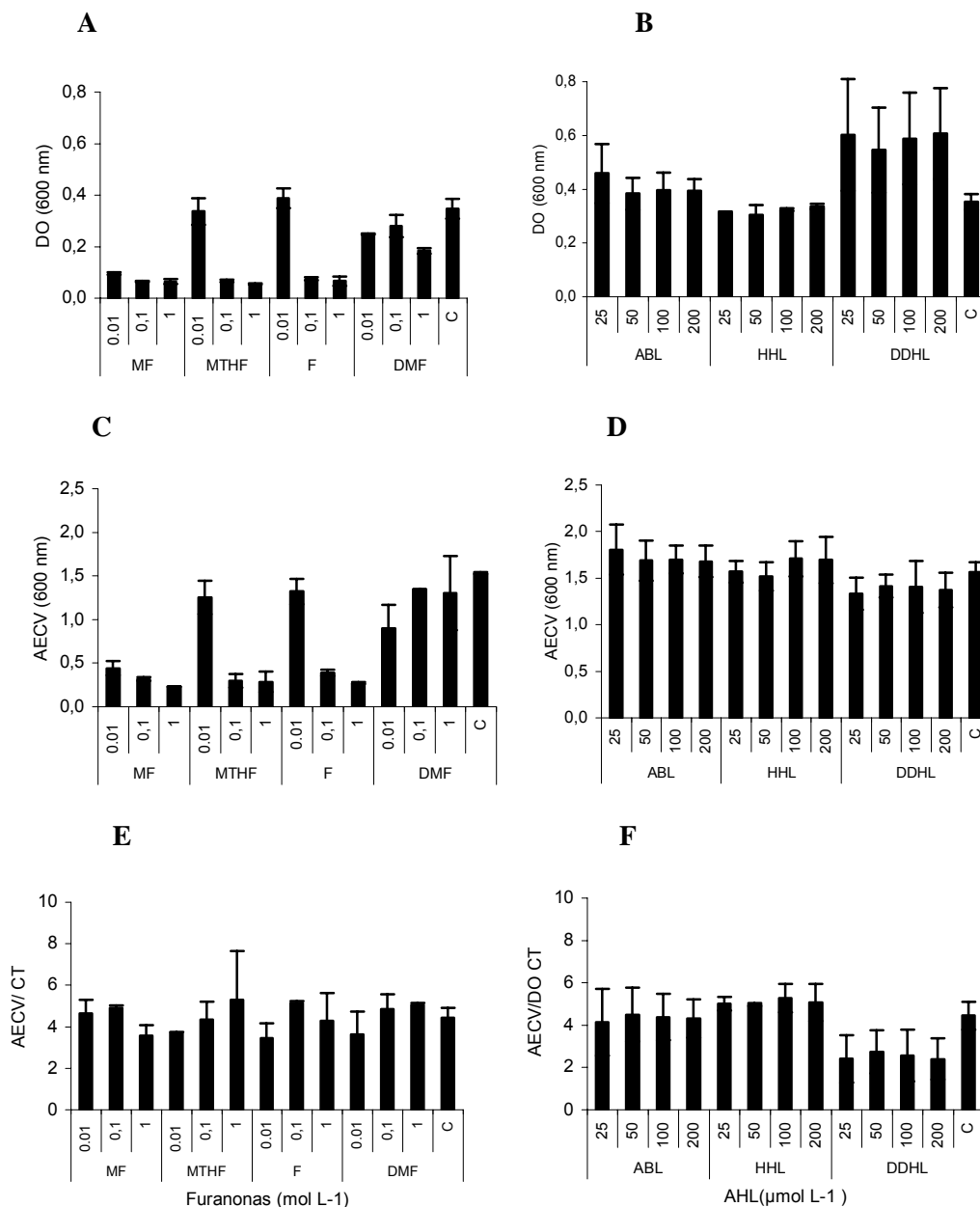


Figura 9 – Crescimento (A e B), formação de biofilme (C e D) e razão entre a absorvância do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais (E e F) de *A. hydrophila* 099 em MMS após 24 h de incubação. MMS adicionado de: 3-metil-2(5H)-furanona (MF); metiltetrahydrofuranona (MTHF); 2(5H)-furanona (F); 2,2-dimetil-3(2H)-furanona (DMF) nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup> e de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL),  $\alpha$ -amino- $\delta$ -butirolactona (ABL) e N-dodecanoil-DL-homoserina lactona (DDHL) nas concentrações de 25, 50, 100 e 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>; (C) Controle; (AECV) absorvância do extrato do cristal violeta; (CT) células totais.

A formação do biofilme por *H. alvei* 059 (Figuras 7B e 7C) foi proporcional ao número de células presentes no meio de cultivo (Figuras 7A e 7B), ou seja, nos substratos com maior crescimento, caracterizado pela maior densidade óptica, houve maior número de células aderidas. Observou-se efeito inibitório significativo ( $P < 0,05$ ) na formação de biofilme de *H. alvei* 059, em presença de furanonas em todas as concentrações avaliadas (Figura 7C). Entretanto, os dados que relacionam o número de células sésseis com as planctônicas indicaram que a adição de furanonas não reduziu significativamente ( $P > 0,05$ ) a formação dos biofilmes (Figuras 7C e 7D) e que a adição de AHL não afetou a formação do biofilme de *H. alvei* 059 comparado ao controle (Figura 7E e 7F).

O comportamento do isolado 071 de *H. alvei* diferiu do observado para o isolado 059, pois a presença de furanonas não afetou o crescimento celular ( $P > 0,05$ ) (Figura 8A) e a formação de biofilme (Figura 8C). Similarmente, a adição de AHLs ao MMS também não afetou o crescimento (Figura 8B) e a formação de biofilme por essa estirpe.

Entretanto, quando a razão entre a densidade óptica relativa às células sésseis e planctônicas foi avaliada, verificou-se redução significativa ( $P < 0,05$ ) na formação de biofilme em presença de MF, MTHF e F em concentração superior a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  comparado ao controle (Figura 8E). A presença de AHL não afetou essa razão (Figura 8F).

Valores menores de densidade óptica foram obtidos para o crescimento de *A. hydrophila* 099 quando concentrações de  $0,01$ ,  $0,1$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de MF e de  $0,1$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de MTHF e F foram adicionadas ao meio de cultivo (Figura 9A), o que confirmou o efeito inibidor das furanonas também sobre esta espécie. Embora a adição dessas substâncias tenha afetado significativamente ( $P < 0,05$ ) a formação de biofilmes por *A. hydrophila* (Figura 9C), essa característica foi proporcional ao número de células, ou seja, nas condições de maior crescimento celular também houve maior formação de biofilme. Os dados apresentados na Figura 9E confirmaram essa evidência, pois não foi constatado efeito significativo ( $P > 0,05$ ) calculando-se a razão entre o crescimento e a formação de biofilmes. A adição de AHLs ao meio de cultivo de *A. hydrophila* não alterou significativamente ( $P > 0,05$ ) nenhum dos parâmetros avaliados (Figuras 10B, 10D e 10F).

A constatação de que a presença das furanonas no meio de cultivo afetou a formação de biofilmes por *H. alvei* 071 (Figuras 8E) pode ser atribuída à inibição do

sistema QS desta bactéria. Furanonas podem ligar-se à proteína LuxR e às suas homólogas sem ativá-las, ou mesmo promover a degradação dessa proteína, e assim impedir a transcrição de genes envolvidos na regulação da formação dos biofilmes (MANEFIELD et al., 1999; RASMUSSEN et al., 2000; HENTZER et al., 2002). Manefield et al. (2002) sugeriram que as furanonas halogenadas induziram uma degradação rápida da proteína LuxR em *V. fischeri*. A inibição da expressão de fenótipos controlados por QS pelas furanonas já foi reconhecido em diversas bactérias. A macroalga australiana *Delisea pulchra* produz furanonas halogenadas para proteger-se da colonização bacteriana ou formação de biofilme em sua superfície (GIVSKOV et al., 1996). Esses autores também demonstraram que a migração denominada *swarming migration* da bactéria patogênica *Serratia liquefaciens* na superfície do ágar foi completamente inibida pela adição de 100 mg L<sup>-1</sup> de (5Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-butil-2(5H)-furanona. Esta molécula também suprimiu a expressão de genes de luminescência localizados em um plasmídeo repórter em *S. liquefaciens*, sem afetar a taxa de crescimento da bactéria. Furanonas também inibem genes de virulência, a exemplo da inibição da produção de toxina extracelular em uma estirpe patogênica de *V. harveyi* (MANEFIELD et al., 2000). Naquele estudo, os autores observaram que houve redução de 50 % de mortalidade no camarão *Penaeus monodon* após a injeção intramuscular de extratos do sobrenadante de culturas de *V. harveyi* cultivado em presença de furanonas halogenadas.

### **3.3.6. Observação de biofilmes de *H. alvei* por microscopia eletrônica de varredura**

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura confirmaram o efeito da adição de 2(5H)-furanona ao meio de cultivo na redução do número de células de *H. alvei* aderidas aos cupons após 24, 48 e 72 h de incubação (Figuras 11A, 12A e 13A). Após 24 h de imersão dos cupons no meio de cultura, grupos de células ainda foram observados, mas nos tempos correspondentes a 48 e 72 h de incubação, em todos os campos, houve predomínio de células isoladas. Outra constatação feita foi a alteração morfológica das células que se apresentaram em formas de cocos e de bastonetes curtos. Considerando que o inóculo inicial de *H.*

*alvei* foi elevado, superior a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, o que permitiria a adesão de um número elevado de células aos cupons de poliestireno e, ainda que a presença de 1 mol L<sup>-1</sup> de 2(5H)-furanona não afetou o crescimento bacteriano, conclui-se que a furanona avaliada inibiu a formação de biofilme. Pode-se inferir ainda que esta inibição do desenvolvimento do biofilme esteja relacionada com interferência no sistema QS de *H. alvei* 071. A atividade inibitória na formação de biofilmes pela furanona 56 foi verificada com *P. aeruginosa* (HENTZER et al., 2002). Essa substância não influenciou o processo de adesão inicial, mas afetou a arquitetura do biofilme e aumentou o processo de desagregação com conseqüente perda de biomassa bacteriana a partir do substrato. Esses autores observaram também que o composto avaliado reduziu a expressão de genes de virulência, o que indicou o efeito geral dessa furanona em genes-alvos do circuito *las* do QS em *P. aeruginosa*. Vários estudos propõem modelos para explicar o modo de ação das furanonas. Alguns autores sugerem que esses antagonistas atuam deslocando os autoindutores de suas proteínas LuxR cognatas, de forma a prevenir a ativação dessas ou se ligam às proteínas LuxR sem ativá-las (MANEFIELD et al., 1999; RASMUSSEN et al., 2000; HENTZER et al., 2002). Manefield et al. (2002) sugeriram que as furanonas halogenadas induziram uma degradação rápida da proteína LuxR em *V. fischeri*. Esses autores demonstraram que a meia-vida da proteína LuxR foi reduzida em 100 vezes na presença de furanonas halogenadas. Em contraste, Zhu e Winans (2001) demonstraram que TraR, uma proteína homóloga a LuxR de *A. tumefaciens*, quando ligada à AHL, apresenta meia-vida de 70 min, mas na ausência desse autoindutor, a meia-vida é de apenas dois minutos. Assim, enquanto o autoindutor protege sua proteína TraR cognata contra a degradação, as furanonas halogenadas aumentam a degradação de LuxR.

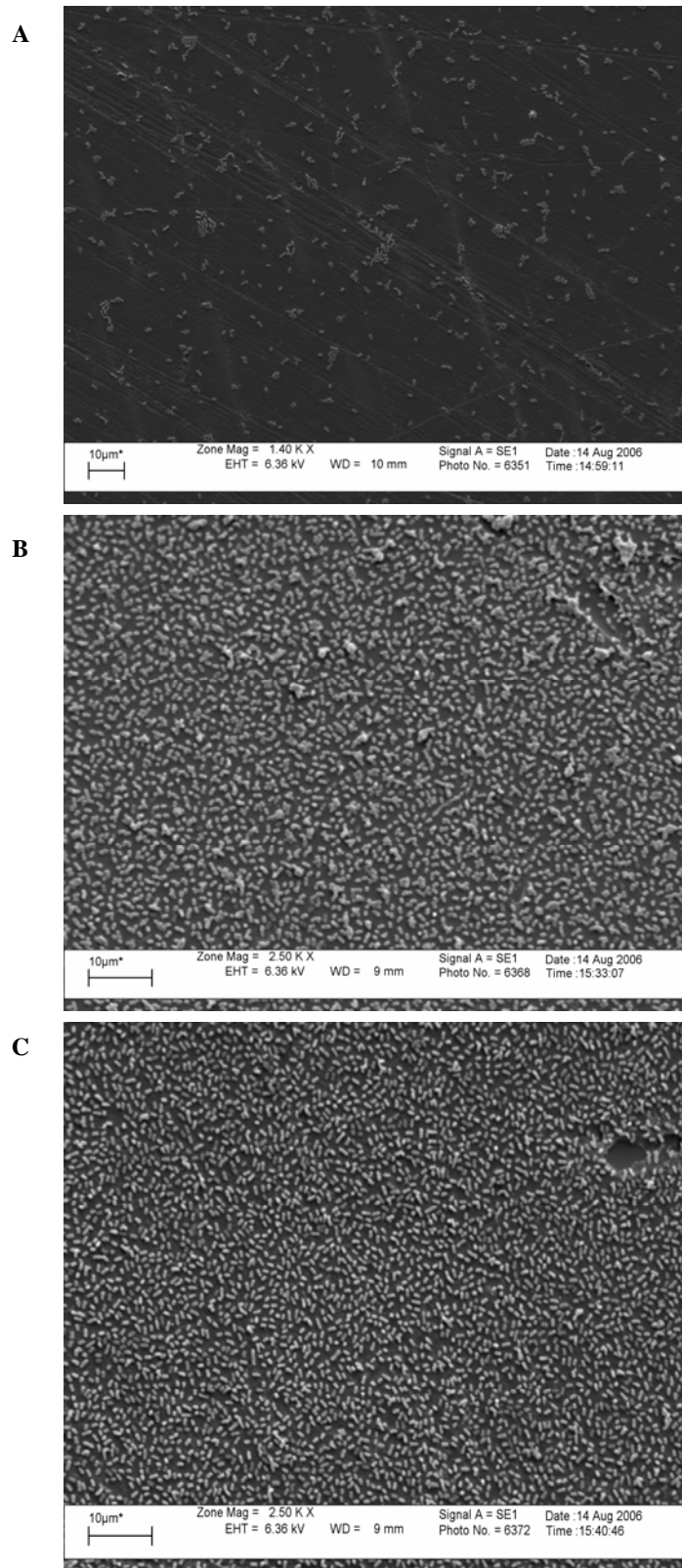


Figura 11 – Microfotografias de biofilmes formados por *Hafnia alvei* 071 em cupons de poliestireno imersos em MMS adicionado de 2(5H) furanona ou HHL após 24 h de incubação. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. (A) 1 mol L<sup>-1</sup> de 2(5H)-furanona; (B) 200 µM de HHL; (C) Controle.

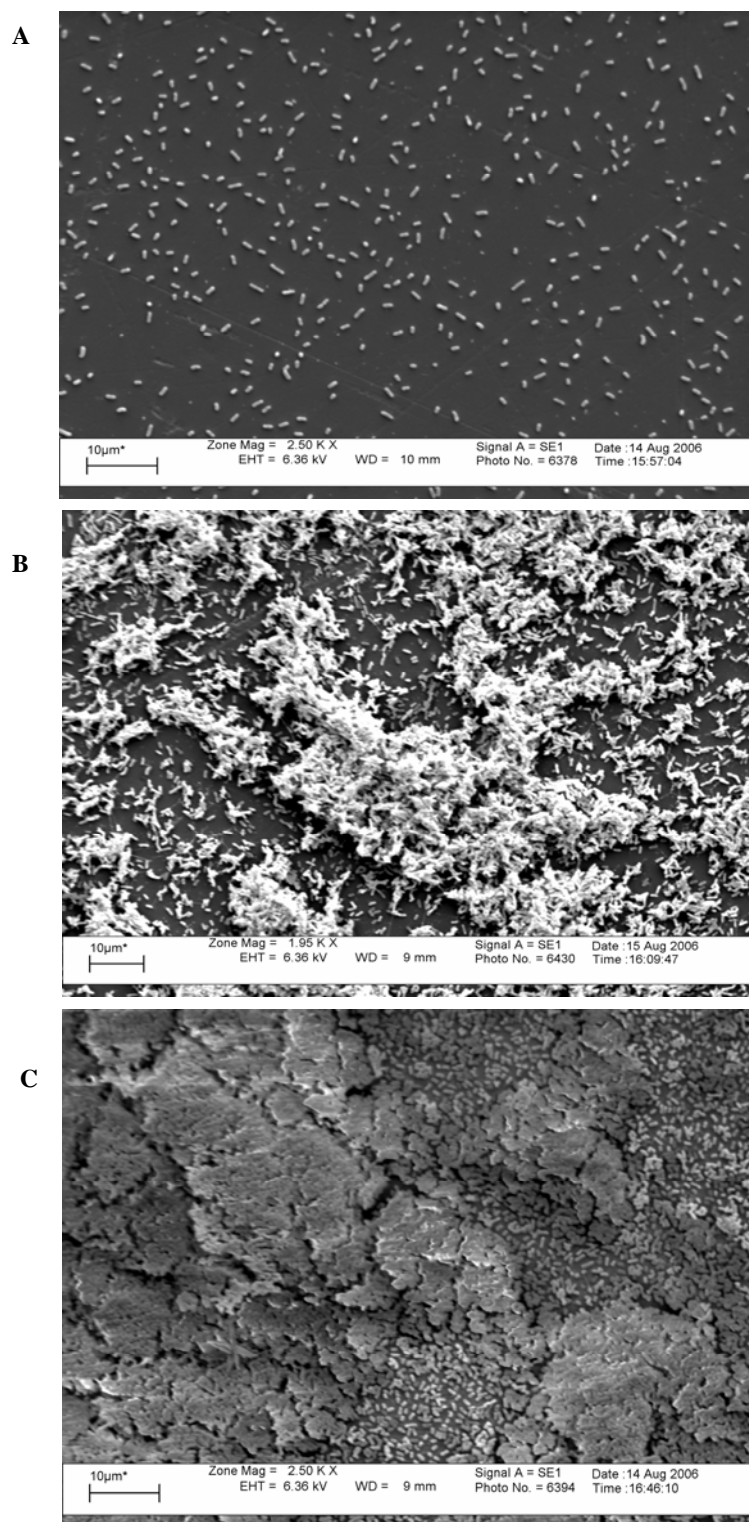


Figura 12 – Microfotografias de biofilmes formados por *Hafnia alvei* 071 em cupons de poliestireno imersos em MMS adicionado de 2(5H) furanona ou HHL após 48 h de incubação. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. (A) 1 mol L<sup>-1</sup> de 2(5H) furanona; (B) 200 μM de HHL; (C) Controle.

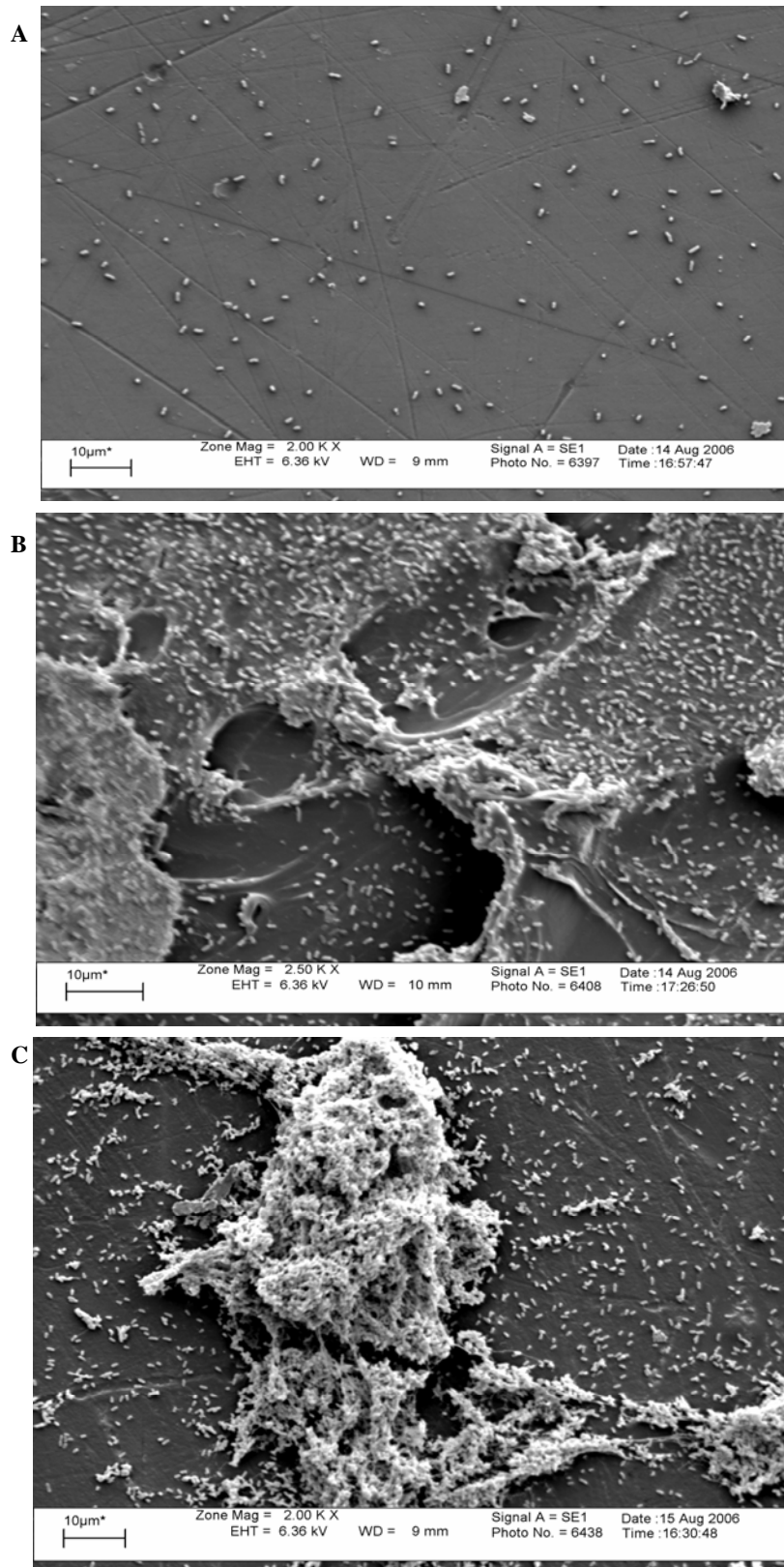


Figura 13 – Microfotografias de biofilmes formados por *Hafnia alvei* 071 em cupons de poliestireno imersos em MMS adicionado de 1 mol L<sup>-1</sup> de 2(5H) furanona ou 200 μM de HHL após 48 h de incubação. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. (A) 1M de 2(5H) furanona; (B) 200 μM de HHL; (C) Controle.

A adição de HHL ao MMS com população superior a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> de *H. alvei* 071 não afetou a formação de biofilme em poliestireno nas condições avaliadas (Figura 11B, 12B e 13B) comparado aos tratamentos-controle (Figuras 11C, 12C, 13C). Os biofilmes formados na presença de HHL e nos tratamentos-controle, sem HHL, apresentaram estrutura tridimensional típica com grande número de células. Provavelmente, a adição de HHL não afetou a formação de biofilmes porque as células de *H. alvei* 071 também produziram AHLs durante o crescimento. Em *P. aeruginosa* há evidências mais diretas do papel das AHLs no desenvolvimento dos biofilmes. Mutações no gene da sintase de AHL *lasI* de *P. aeruginosa*, responsável pela síntese de 3-oxo-C12-HSL, mas não em *rhlI* (que dirige a síntese de n-butanil homoserina lactona [C4-HSL]), apresentou efeito inibitório significativo no desenvolvimento do biofilme (DAVIES et al., 1998). As bactérias mutantes *lasI* foram incapazes de formar um biofilme espesso e estruturado, característico do formado pela estirpe parental selvagem (DAVIES et al., 1998).

Batchelor et al. (1997) demonstraram a contribuição das AHLs na biologia do biofilme formado por *Nitrosomonas europaea*. O papel do QS na formação de biofilme é também reportado em *Burkholderia cepacia* (GOTSCHLICH et al; 2001; HUBER et al.; 2001; CONWAY et al.; 2002). Lynch et al. (2002) avaliaram a formação de biofilme pela estirpe selvagem de *A. hydrophila* e seu mutante, deficiente na produção de C4-HSL, e verificaram que a estirpe mutante falhou em formar um biofilme maduro, sendo que essa capacidade foi restaurada pela adição de C4-HSL exógena.

Embora a adição de AHLs não tenha resultado em efeito perceptível na formação de biofilme por *H. alvei* 071, ficou evidente que o QS regula a formação do biofilme por essa estirpe, visto que sua formação foi inibida em presença de furanona, uma molécula análoga à AHL; porém, incapaz de ativar os genes regulados pelo QS.

### **3.3.7. Caracterização das homoserinas lactonas aciladas**

O sistema de QS da estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47 foi ativado pelas AHLs padrão N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL) e N-decanoil-DL-homoserina lactona (DHL) (Tabela 3, Figura 14), enquanto o de *E. coli* pSB403 e de

*C. violaceum* CV026 responderam ao padrão HHL (Tabela 3, Figuras 15 e 16). Segundo McClean et al. (1997), *C. violaceum* CV026 respondeu a C4-HSL, oxo C4HSL, C8-HSL, oxo-C8-HSL. Já a estirpe *A. tumefaciens* WCF47 respondeu a moléculas de seis e oito carbonos com ou sem substituição oxo no estudo realizado por ZHU et al. (2003).

A presença de AHL nos extratos das células sésseis e planctônicas de *H. alvei* 059, 067 e 071 foi confirmada por CCD, usando-se os monitores *A. tumefaciens* WCF47 (Figura 14), *E. coli* pSB403 (Figura 15) e *C. violaceum* CV026 (Figura 16). Exceção ocorreu para o extrato de células sésseis de *H. alvei* 067, que não induziu a produção de violaceína por *C. violaceum* CV026 (Figura 16). Esse resultado não significa, porém, que *H. alvei* 067 não produz AHL no estado sésstil. Segundo SHAW et al. (1997), quando o extrato não ativa a estirpe monitora, não se deve concluir que não existe presença de AHL. É possível que a bactéria avaliada produza moléculas não-detectáveis pela estirpe repórter ou que as mesmas estejam em concentrações insuficientes para ativar a monitora.

Comparando-se os valores de *Rf* das manchas do padrão de HHL com os dos extratos (Tabela 3), é possível inferir que *H. alvei* produziu AHLs com cadeias carbônicas similares a HHL com ou sem substituições na cadeia acilada. Também se constatou a produção de moléculas com cadeias carbônicas de tamanhos inferiores a seis carbonos (Tabela 3, Figuras 14, 15 e 16). Valores maiores de *Rf* significam presença de AHLs menores que migraram na frente das demais, enquanto moléculas maiores apresentaram *Rf* menores e migram mais lentamente (Tabela 3). Embora os formatos das manchas obtidas sejam diferentes, os derivados oxo e hidroxil de mesmo comprimento da cadeia migram com mobilidades indistinguíveis no sistema de solventes. A presença de moléculas de AHL com o mesmo comprimento da cadeia acil, mas com substituições oxo ou hidroxil, pode mascarar a presença de outra, ou seja, a presença de um composto fortemente ativo pode mascarar a presença de um fracamente ativo que migra com um *Rf* similar, mas não idêntico (SHAW et al., 1997).

Tabela 3 – Fatores de retardamento obtidos para os padrões e extratos dos sobrenadantes de células sésseis e planctônicas de *H. alvei* 059, 067 e 071. Os cromatogramas foram revelados com as estirpes monitoras *A. tumefaciens* WCF47, *C. violaceum* CV026, e *E. coli* pSB403

<b><i>A. tumefaciens</i> WCF47</b>			
	<b>DPA (cm)<sup>1</sup></b>	<b>DPS (cm)<sup>2</sup></b>	<b>Rf<sup>3</sup></b>
1. $\alpha$ -amino- $\delta$ -butirolactona hidrobrometo	0	16,5	-
2. N-hexanoil-DL-homoserina lactona	9,6	16,5	0,58
3. N-decanoil-DL-homoserina lactona	6,7	16,5	0,41
	3,8		0,23
4. N-dodecanoil-DL-homoserina lactona	0	16,5	-
5. N-tetradecanoil-DL-homoserina lactona	0	16,5	-
6. Extrato do MMS	0	16,5	-
7. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 059	11,4	16	0,71
	9		0,56
8. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 059	11,5	16	0,72
9. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 067	11,5	16	0,72
10. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 067	11,4	16,1	0,71
	9,1		0,57
11. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 071	11,3	16,2	0,70
	9,1		0,56
12. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 071	11,3	16,2	0,70
	9,1		0,56
<b><i>E. coli</i> pSB403</b>			
1. N-hexanoil-DL-homoserina lactona	9,2	18	0,51
2. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 059	12	18	0,67
3. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 059	12	18	0,67
4. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 067	12,2	18	0,68
5. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 067	11,9	18	0,66
6. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 071	11,6	18	0,64
7. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 071	11,1	18	0,62
<b><i>C. violaceum</i> CV026</b>			
1. N-hexanoil-DL-homoserina lactona	9	17	0,53
2. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 059	11,2	16,9	0,66
	9		0,53
3. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 059	11,2	16,7	0,67
	9,2		0,55
4. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 067	-	-	-
5. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 067	11,2	16,8	0,67
	9		0,54
6. Extrato de células sésseis de <i>H. alvei</i> 071	11,2	16,8	0,67
	9,1		0,54
7. Extrato de células planctônicas de <i>H. alvei</i> 071	11,4	17	0,67
	9,1		0,54

<sup>1</sup>DPA. Distância percorrida pela amostra;

<sup>2</sup>DPS. Distância percorrida pelo solvente;

<sup>3</sup>Rf – fator de retardamento.

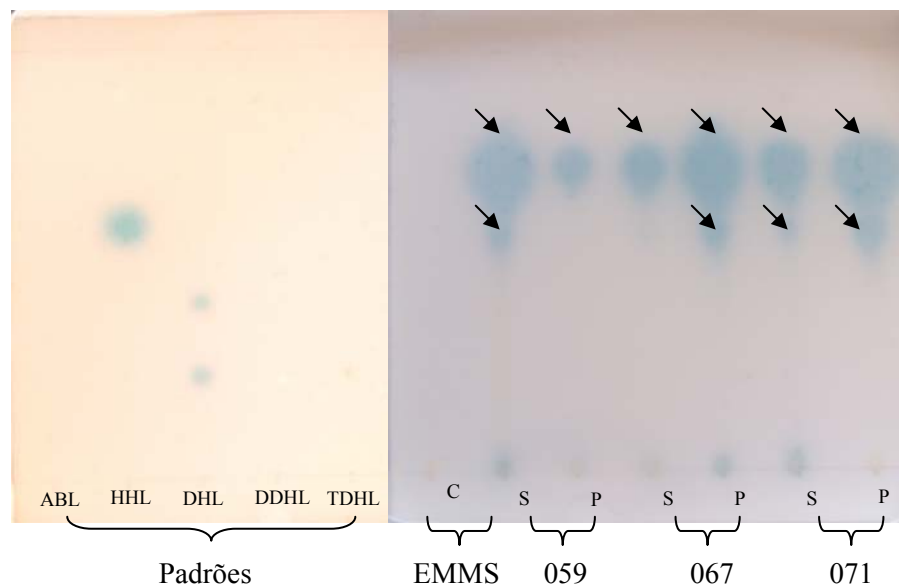


Figura 14 – Cromatografia em camada delgada dos extratos de AHLs obtidos das células sésseis e planctônicas de *H. alvei* 059, 067 e 071 cultivadas em MMS, por 24 h, revelada com a estirpe monitora *A. tumefaciens* WCF47. Padrões:  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona hidrobrometo (ABL); N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL); N-decanoil-DL-homoserina lactona (DHL); N-dodecanoil-DL-homoserina lactona (DDHL); N-tetradecanoil-DL-homoserina lactona (TDHL); (EMMS) extrato do MMS; (S) extrato das células sésseis (P) extrato das células planctônicas.

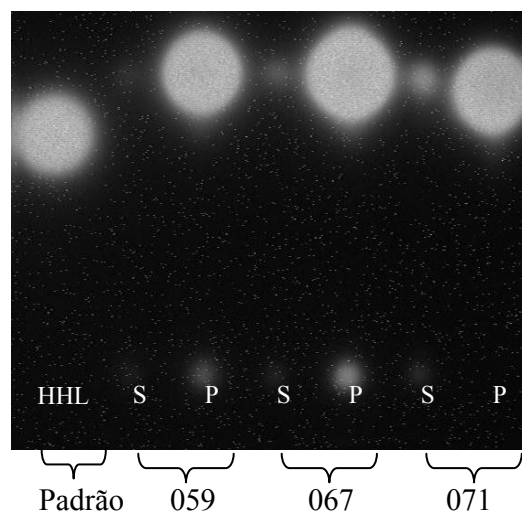


Figura 15 – Cromatografia em camada delgada dos extratos de AHLs obtidos das células sésseis e planctônicas de *H. alvei* 059, 067 e 071 cultivadas em MMS por 24 h e revelada com a estirpe monitora *E. coli* pSB403. Padrão: N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL); (S) extrato das células sésseis; (P) extrato das células planctônicas.

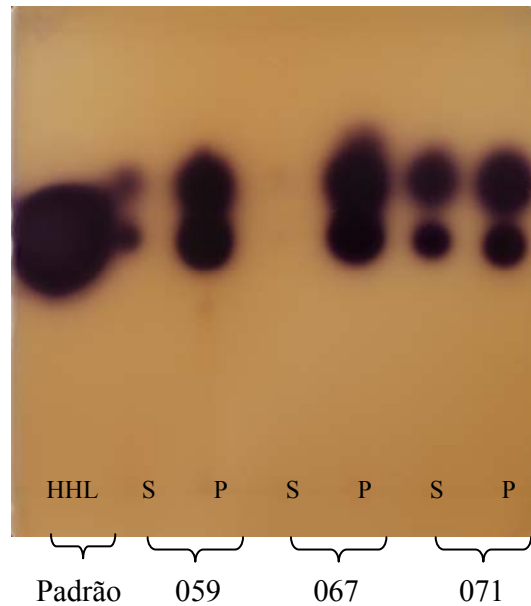


Figura 16 – Cromatografia em camada delgada dos extratos de AHLs obtidos das células sésseis e planctônicas de *H. alvei* 059, 067 e 071 cultivadas em MMS por 24 h revelada com a estirpe monitora *C. violaceum* CV0126. Padrão: N-hexanoil-DL-homoserina lactona (HHL); (S) extrato das células sésseis; (P) extrato das células planctônicas.

A produção de AHL de seis carbonos por *H. alvei* já foi relatada. De acordo com Bruhn et al. (2004), os sobrenadantes de seis estirpes de *H. alvei* isoladas de carne embalada a vácuo e dos extratos de carnes deterioradas revelaram que a AHL predominante tinha um valor de  $R_f$  e forma similar a N-3-oxo-hexanoil homoserina lactona (OHHL), sendo sua presença confirmada pela espectrometria de massa.

Verificou-se que os valores de  $R_f$  variaram entre os ensaios, a exemplo do padrão de HHL, que apresentou valores entre 0,51 e 0,58 (Tabela 3). Fatores como quantidade e concentração da amostra aplicada, temperatura ambiente e condições de saturação da câmara podem interferir nos diferentes perfis de migração das amostras. Shaw et al. (1997) também afirmaram que os valores de  $R_f$  diferiram ligeiramente de um experimento para outro, tendo por isso aplicado todos os padrões em um único cromatograma.

Nos extratos de células sésseis, a resposta da estirpe monitora foi sempre menos intensa (Figuras 14, 15 e 16), o que pode ser consequência da obtenção de extrato a partir de menor concentração de células sésseis em relação ao extrato de células planctônicas. A difusão das AHLs produzidas pelas células do biofilme para o meio circundante ou a síntese de menor quantidade desses autoindutores em

relação às células planctônicas podem outras explicações para o resultado encontrado.

A presença de AHL nos extratos de células sésseis detectadas por CCD reforça as evidências de que o mecanismo de QS está envolvido na formação do biofilme pelas estirpes de *H. alvei* avaliadas. Estudos futuros devem ser conduzidos a fim de elucidar o envolvimento do QS nas etapas de formação do biofilme por essas bactérias. Devem-se considerar ainda as observações de Shaw et al. (1997) de que a CCD deve ser interpretada com cautela, pois a técnica é limitada às AHLs às quais a estirpe monitora pode responder. Além disso, o sinal deve estar presente em quantidades detectáveis pela estirpe repórter, pois as proteínas R são altamente específicas à sua AHL cognata, mas respondem a análogos, se presentes em concentrações suficientemente altas. Sendo assim, as AHLs serão detectadas com menor sensibilidade quanto mais diferentes forem da AHL cognata.

### 3.4. CONCLUSÕES

As microfotografias obtidas por microscopia de epifluorescência evidenciaram que as estirpes *H. alvei* 067, 071 e *A. hydrophila* 099 são capazes de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável e, portanto, apresentam potencial para colonizarem superfícies de processamento de alimentos e equipamentos.

Foi possível verificar que a formação dos biofilmes é um processo dinâmico e influenciado por fatores inerentes às condições de cultivo e às propriedades individuais dos microrganismos.

A constatação de que células do biofilme produzem AHLs sugere que o QS desempenha alguma função na regulação da formação dessas estruturas nas estirpes avaliadas. *H. alvei*, tanto na forma livre quanto na planctônica, destacou-se como maior produtora de AHL, por ter induzido resposta mais intensa nas monitoras. As estirpes monitoras utilizadas apresentaram graus diferenciados de sensibilidade às AHLs produzidas pelas estirpes avaliadas.

O efeito inibitório das furanonas na formação de biofilmes por *H. alvei* 071, constatado no ensaio de formação de biofilmes em microplacas e nas imagens obtidas por microscopia eletrônica, demonstrou o possível envolvimento do sistema *quorum sensing* na formação dessas estruturas. Os resultados evidenciaram também que moléculas análogas às AHLs, como furanonas, podem ser usadas no controle de biofilmes.

### 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BATAINEH, S.A., BRITCHER, L.G., GRIESSE, H.J. XPS characterization of the surface immobilization of antibacterial furanones. **Surface Science**, v. 600, p. 952, 962, 2006.

ALLISON, D.G., RUIZ, B., SanJOSE, C., JASPE, A. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 179-184, 1998.

BAL'A, M. F., A., JAMILAH, I., D., MARSHALL, D. L. Attachment of *Aeromonas hydrophila* to stainless steel surfaces. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 18, p. 642-649, 1998.

BALESTRINO, D., HAAGENSEN, J. A., RICH, C., FORESTIER, C. Characterization of type-2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 8, p. 2870- 2005.

BATCHELOR, S. E., COOPER, M, CAHHABRA, S. R., GLOVER, L. A., STEWART, G. S. A. B., WILLIAMS, P., PROSSER, J.J. Cell-density regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2261-2266, 1997.

BORCHARDT, S.A., ALLAIN, E.J., MICHELS, J.J., STEARNS, G.W., KELLY, R.F., McCOY, W.F. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3174-3179, 2001.

BOWER, C. K., Mc GUIRE, J., DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1996.

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.

CHA, C., GAO, P., CHEN, Y-C., SHAW, P.D., FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing by Gram-negative plant-associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.11, p.1119-1129, 1998.

CHARLTSTON, T. S., de NYS, R., NETTING, A., KUMAR, N., HENTZER, M., GIVSKOV, M., KJELLEBERG, S. A novel and sensitive method for the quantification of *N*-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. **Environmental Microbiology**, v. 2, p.530-541, 2000.

CHMIELESWSKI, R. A. N., FRANK, J. F. Biofilm Formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 22-30, 2003.

CONWAY, B. A. D., VENU, V., SPEERT, D. P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5678-5685, 2002.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A Review. **Journal of Food Protection**, v.45, p.172-207, 1982.

CRUZ, C.D. Programa Genes: estatística experimental e matrizes. Viçosa: editora UFV, 2006a, 285 p.

CRUZ, C.D. Programa Genes: versão Windows. Viçosa-MG, versão 2006b. 4.1.

DAVIES, D. G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P, IGLEWSKI, B. H., COSTERNON, J. W., Greenberg, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

De NYS, R., STEINBERG, P, WILLEMSEM, P., DWORJANYN, S., GABELISH, C., KING, R. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling. **Biofouling**, v.8, p. 259, 1995.

DESMASURES, N. **Etude de laits de haute qualite: caracterisation et aptitudes microbiologiques a la transformation en camembert au lait cru**. Tese (Ph.D.). Institute of Biochemistry and Applied Biology, University of Caen, Caen, France, 1995.

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., ZHANG, X.-F., XU, J.-L., ZHANG, L.H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 954-960, 2004.

FRANK, J.F. Milk and dairy products, p. 101-116. In: DOYLE, P., BEUCHAT, R., MONTVILLE, J. **Food Microbiology - Fundamentals and frontiers**, Washington, 1997.

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.

GHAURI, M.A., OKIBE, N., JOHNSON, D.B. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: the significance of species and strain variations. **Hydrometallurgy**, 2006. In press.

GIVSKOV, M., NYS, R., MANEFIELD, M., GRAM, L., MAXIMILIEN, L. E., MOLIN, S, STEINBERG, P. D., KJELLEBERG, S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 22, p. 6618-6622, 1996.

GIVSKOV, M, EBERL, L., MOLIN, S. Control of exoenzyme production, motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 148, p. 115-122, 1997.

GOTSCHILICH, A, HUBER, B, GEISWENBERGER, O., TOGI, A., STEIDLE, A., RIEDEL, K, HILL, P., TUMMLER, B, VANDAMME, P., MIDDLETON, B, CAMARA, M., WILLIAMS, P, HARDMAN A., EBERL, L. Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is widespread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 1-14, 2001.

GRAM, L. CHRISTENSEM, A. B., RAVN, L., MOLIN, S. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of *Enterobacteriaceae* isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3458-3463, 1999.

GRIFFITHS, M.W. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychotropic bacteria during growth in milk. **Milchwissenschaft**, v.44, p.539-543, 1989.

HENTZER, M., RIEDEL, K., RASMUSSEN, T.B., HEYDORN, A., ANDERSEN, J.B., PARSEK, M.R., RICE, S.A., EBERL, L., MOLIN, S., HOIBY, N., KJELLEBERG, S., GIVSKOV, M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology**, v. 148, p. 87-102, 2002.

HOOD, E.P., ZOTTOLA, E.A. Isolation and identification of adherent and identification of adherent Gram-negative microorganisms from four meat – processing facilities. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1135-1138, 1997.

HUBER, B., RIEDEL, K., HENTZER, M., HEYDORN, A., GOTSCHLICH, M., GIVSKOV, M., MOLIN, S., EBERL, L. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v. 147, p. 2517-2528, 2001.

HUNT, S.M., WERNER, E.M., HUANG, B., HAMILTON, M.A., STEWART, P.S. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7418-7425, 2004.

JACK, R. F., RINGELBERG, D. B., WHITE, D. C. Differential corrosion rates of carbon steel by combinations of *Bacillus* sp., *Hafnia alvei* and *Desulfovibrio gigas* established by phospholipid analysis of electrode biofilm. **Corrosion Science**, v. 33, n. 12, p. 1843-1853. 1992.

JANDA, J.M. ABOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: a expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infections Disease**, v. 27, p. 332-344, 1988.

KAPLAN, H.B., GREENBERG, E.P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. **Journal of Bacteriology**, v.63, 12, p. 1210-1214, 1985.

KUMAR, C. G., ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

LIN, Y.-H, XU, J.-L, WANG, L.-H, ONG, S.L., LEADBETTER, J.R., ZHANG, L.-H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* sp. Strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. **Molecular Microbiology**, v. 47, p.849-860, 2003.

LYNCH, M. J., SWIFT, S., KIRKE, D. F., KEEVIT, W., DODD, C. E. R., WILLIAMS, P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 18-28, 2002.

MACHADO, A.D. S. **Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal**. 74 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

MCCLEAN, K.H., WINSON, M.K., FISH, L., TAYLOR, A., CHHABRA, S.R., CAMARA, M., DAYKIN, M., LAMB, J.H., SWIFT, S., BYCROFT, B.W., STEWART, G.S. and WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, p. 3703-3711, 1997.

McLEAN, R. J. C., WHITELEY, M., STICKLER, D. J., FUQUA, W.C. Evidence of autoinducer activity in a naturally occurring biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, p. 259-263, 1997.

MÄE, A., MONTESANO, M., KOIV, V., PALVA, E.T. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibited enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 1035-1042, 2001.

MANEFIELD, M., de NYS, R., KUMAR, N., READ, R., GIVSKOV, M., STEINEBERG, P., KJELLEBERG, S. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. **Microbiology**, v. 145, p. 283-291, 1999.

MANEFIELD, M., HARRIS, L., RICE, S.A., de NYS, R., KJELLEBERG, S. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2079-2084, 2000.

MANEFIELD, M., RASMUSSEN, T.B., HENZTER, J.B., ANDERSEN, P., STEINBERG, S., KJELLEBERG, S., GIVSKOV, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. **Microbiology**, v.148, p.1119-1127, 2002.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P., ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, v. 161, p. 334-346, 2006.

MURPHY, S.C., BOOR, K.J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.20, n.8, p.606-611, 2000.

NICODÈME M., GRILL, J.P., HUMBERT, G., GAILLARD, J.L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p. 641-648, 2005.

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., Val, D.L., HANZELKA, B.L., CRONAN Jr., J.R., GRENBORG, E.P. Acyl homoserine-lactone quorum sensing signal generation. **Proceedings National Academy of Science of U.S.A.**, v. 96, p. 4360-4365, 1999.

PEARSON, J.P., VAN DELDEN C., IGLEWSKI. Active efflux and diffusion are involved in transport in *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.1203-1210, 1999.

PINTO, C.L.O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT**. 97p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

PINTO, U.M., VIANA, E.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**, 2006. In press.

RAJMOHAN, S., DODD, C.E.R., WAITES, W.M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.205-213, 2002.

RASMUSSEN, T.B., MANEFIELD, M., ANDERSEN, J.B., EBERL, L., ANTHONY, U., CHRISTOPHERSEN, C., STEINBERG, P., KJELLEBERG, S., GIVSKOV, M. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. **Microbiology**, v. 146, p. 3337-3244, 2000.

RAVN, L., CHRISTENSEN, A.B., MOLIN, S., GIVSKOV, M., GRAM, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. **Journal of Microbiological Methods**, v.44, p.239-251, 2001.

REVERCHON, S., CHANTEGREL, B., DESHAYES, 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. 1153-1157, 2002.

RICE, S. A., KOH, K.S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n.10, p. 3477-3485, 2005.

RIEDEL, K., OHNERSORG, T., KROGFELT, K.A., HANSE, T., OMORI, K., GIVSKOV, M., EBERL, L. N-acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the Lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n.5, p. 1805-1809, 2001.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 432-437, 1994.

SHAW, P.D., PING, G., DALY, S.L., CHUNG, C., CRONAN, J.E., RINEHART, K. L., FARRAND, S. K. Detection and characterizing N-acil-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.6036-6041, 1997.

SAKAZAKI, R., TAMURA, K. The genus *Hafnia*. In: Ballows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (eds). **The Prokaryotes, a handbook on the biology of the bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**, Berlin: Springer-Verlag, p. 2816-2821, 1992.

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.

SØRHAUG, T., STEPANIAK, L. Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. **Food Enzymology**, vol. 1, p.169-218, 1991.

SØRHAUG, T., STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-40, 1997.

SUMMERFELT, S.T., Ozonation and UV irradiation- an introduction and examples of current applications. **Aquatic Engineering**, v. 28, p. 2136, 2003.

SWIFT, S., KARLYSHEW, A.V., FISH, L., DURANT, E.L., WINSON, M.K., CHHABRA, S.R., WILLIAMS, P., MACINTYRE, S., STEWART, G.S. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 5271-5281, 1997.

THOMAS, S. B., THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. **Dairy Industry**, v. 38, p. 61–70, 1973.

Van HOUTT, R., AERSTSEN, A. JANSSEN, A., QUINTANA, A.L., MICHIELS, C.W. Biofilm formation and cell-to-cell signaling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 177-184, 2004.

WHITEHEAD, N.A., BARNARD, A.M.L., SLATER, H., SIMPSON, N.J.L., SALMOND, G.P.C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.365-404, 2001.

WHITELEY, M., BROWN, E., McLEAN, R. J. C. An inexpensive chemostat apparatus for the study of microbial biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, p. 125-132, 1997.

ZHU, J., CHAI, Y., ZHONG, Z., LI, S., WINANS, S.C. *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of n-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6949-6953, 2003.

ZHU, J., WINANS, S.C. The quorum sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. **Proceedings National. Academy Science USA**, v. 98, p. 1507-1512, 2001.

ZHU, J., MILLER, M.B., VANCE, R.E., DZIEJMAN, M., BASSLER, B.L., MEKALANOS, J.J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Proceedings National. Academy Science USA**, v. 99, p. 3129–3134, 2002.

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.

## APÊNDICE A

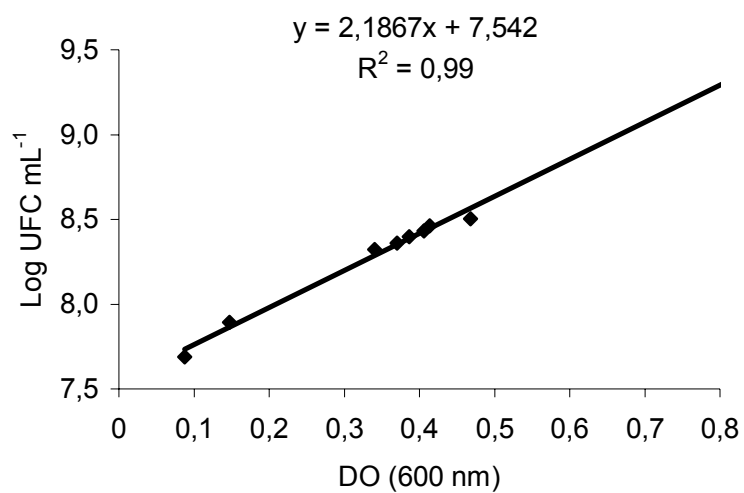


Figura 1A – Relação entre logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro e densidade óptica a 600 nm.

## APÊNDICE B

### Análise de Variância

Quadro 1B – Análise de variância da densidade óptica de culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 24 h de incubação

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	11	0,10249*
Ambientes	4	4,0775*
Trat. x Amb.	44	0,01427*
Resíduo	60	0,00151
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 2B – Análise de variância da formação de biofilmes por culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 24 h de incubação

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	11	0,03775*
Ambientes	4	0,13325*
Trat. x Amb.	44	0,00586*
Resíduo	60	0,0042
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 3B – Análise de variância da relação percentual entre células sésseis e planctônicas de estirpes de *P. fluorescens* cultivadas em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 24 h de incubação

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	11	2070,97848*
Ambientes	4	21310,76704*
Trat. x Amb.	44	248,88713*
Resíduo	60	19,17818
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 4B – Análise de variância da densidade óptica de culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 48 h de incubação

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	11	0,09228*
Ambientes	4	3,53026*
Trat. x Amb.	44	0,01522*
Resíduo	60	0,00063
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 5B – Análise de variância da formação de biofilmes por culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 48 h de incubação

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	11	0,02682*
Ambientes	4	0,14253*
Trat. x Amb.	44	0,01583*
Resíduo	60	0,00165
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 6B – Análise de variância da relação percentual entre células sésseis e planctônicas de estirpes de *P. fluorescens* cultivadas em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 48 h de incubação

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	11	1899,72099*
Ambientes	4	14458,97275*
Trat. x Amb.	44	489,64213*
Resíduo	60	53,39682
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 7B – Análise de variância da densidade óptica de culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 72 h de incubação

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	11	0,08229*
Ambientes	4	2,34552*
Trat. x Amb.	44	0,02065*
Resíduo	60	0,00161
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 8B – Análise de variância da formação de biofilmes por culturas de *P. fluorescens* em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 72 h de incubação

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	11	0,02823*
Ambientes	4	0,00328*
Trat. x Amb.	44	0,00458*
Resíduo	60	0,0003
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 9B – Análise de variância da relação percentual entre células sésseis e planctônicas de estirpes de *P. fluorescens* cultivadas em meios ABT, LB, MMS, TYEP e TYEP adicionado de CaCl<sub>2</sub> após 72 h de incubação

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	11	1624,79464*
Ambientes	4	8311,52443*
Trat. x Amb.	44	188,12135*
Resíduo	60	11,15521
Total	119	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Quadro 10B – Análise de variância do crescimento da estirpe *H. alvei* 059 em MMS adicionado de furanonas

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,0196*
Resíduo	13	0,002446
Total	25	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 11B – Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 059 em MMS adicionado de furanonas

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,128927*
Resíduo	13	0,012515
Total	25	

\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 12B – Análise de variância do cálculo de relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 059 em MMS adicionado de furanonas

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	10773,0901 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	4275,216092
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 13B – Análise de variância do crescimento da estirpe *H. alvei* 059 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	0,006361 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,005431
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 14B – Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 059 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	0,041762 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,146085
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 15B – Análise de variância da relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 059 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	1374,726114 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	4109,897662
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 16B – Análise de variância do crescimento da estirpe *H. alvei* 071 em MMS adicionado de AHLs

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,0019 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,000792
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 17B – Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 071 em MMS adicionado de AHLs

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,191657 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,80508
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 18B – Análise de variância da relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 071 em MMS adicionado de AHLs

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	78059,790244*
Resíduo	13	16395,230262
Total	25	

<sup>ns</sup> Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 19B – Análise de variância do crescimento da estirpe *H. alvei* 071 em MMS adicionado de AHLs

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,36542 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,017954
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 20B – Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 071 em MMS adicionado de AHLs

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,5927 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,34454
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 21B – Análise de variância da relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *H. alvei* 071 em MMS adicionado de AHLs

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	153908,415045 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	241495,535162
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 22B – Análise de variância do crescimento da estirpe *P. fluorescens* 097 em MMS adicionado de furanonas

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,002098 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,001169
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 23B – Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *P. fluorescens* 097 em MMS adicionado de furanonas

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,190938*
Resíduo	13	0,025408
Total	25	

<sup>ns</sup> Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 24B – Análise de variância da relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *P. fluorescens* 097 em MMS adicionado de furanonas

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	48675,594896 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	28070,597646
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 25B. Análise de variância do crescimento da estirpe *P. fluorescens* 097 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	0,000612 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,003292
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 26B – Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *P. fluorescens* 097 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	0,19714*
Resíduo	13	0,05669
Total	25	

<sup>ns</sup> Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 27B – Análise de variância da relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *P. fluorescens* 097 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	8360,316302 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	88108,038931
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 28B – Análise de variância do crescimento da estirpe *A. hydrophila* 099 em MMS adicionado de furanonas

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,032722*
Resíduo	13	0,003146
Total	25	

<sup>ns</sup> Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 29B. Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *A. hydrophila* 099 em MMS adicionado de furanonas

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,533932*
Resíduo	13	0,026008
Total	25	

<sup>ns</sup> Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 30B – Análise de variância da relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *A. hydrophila* 099 em MMS adicionado de furanonas

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	88528,498253 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	73205,922877
Total	25	

<sup>ns</sup> Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 31B – Análise de variância do crescimento da estirpe *A. hydrophila* 099 em MMS adicionado de AHLs

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	12	0,026612 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,11508
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 32B – Análise de variância da formação de biofilme pela estirpe *A. hydrophila* 099 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	0,046999 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,036415
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.

Quadro 33B – Análise de variância da relação percentual entre crescimento e formação de biofilme pela estirpe *A. hydrophila* 099 em MMS adicionado de AHLs

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio</b>
Tratamentos	12	23666,386014 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	9670,095223
Total	25	

<sup>ns</sup> Não-significativo a 5 % de probabilidade pelo teste Dunnet.