

ADRIANA DOS REIS PONCE

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS REGULADAS POR QUORUM SENSING
EM *Aeromonas hydrophila***

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
2011

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

T

P792c
2011

Ponce, Adriana dos Reis, 1982-

Características fenotípicas reguladas por *quorum sensing*
em *Aeromonas hydrophila* / Adriana dos Reis Ponce.

– Viçosa, MG, 2011.

xii, 96f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 69-76.

1. Comunicação celular. 2. Enzimas proteolíticas.
3. Biofilmes. 4. *Aeromonas hydrophila*. 5. Alimentos -
Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 571.6

ADRIANA DOS REIS PONCE

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS REGULADAS POR QUORUM SENSING
EM *Aeromonas hydrophila***

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: 28 de Novembro de 2011.

Prof^a. Maria Cristina Baracat-
Pereira
(Coorientadora)

Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Prof. Uelinton Manoel Pinto

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Aos meus pais e
irmã pelo amor, compreensão,
incentivo e apoio em todos os
momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortificar diante de todos os obstáculos, pelas oportunidades que a vida me reservou e por me conceder o que me há de mais valioso, minha família.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela formação e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À minha família, que é o suporte para todas as minhas conquistas.

Aos meus pais, Antonio e Giselda, pelos ensinamentos de vida, imenso amor, incentivo, dedicação e por não medirem esforços para me ajudar.

A minha querida irmã Priscila pela amizade e companheirismo.

Aos meus avós, Antonio, Conceição (*In memoriam*), Dirce, Jurandir e Jorgina que sempre estiveram presentes apesar da distância.

Aos demais familiares, em especial a tia Denise e tia Alessandra pelo incentivo.

Ao Raphael, pelo amor, paciência e apoio em todos os momentos.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, a minha gratidão pela orientação, confiança, atenção, incentivo e pelos ensinamentos, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À professora Andrea de Oliveira Barros Ribon, por todos os conselhos, dicas, atenção, disponibilidade em ajudar e participação direta durante a execução deste trabalho.

À professora Maria Cristina Baracat-Pereira pela atenção, aconselhamentos e sugestões.

À professora Elza Fernandes de Araújo pela coorientação.

À professora Denise Mara Soares Bazzoli e professor Uelinton Manoel Pinto, pela atenção, sugestões e disponibilidade em ajudar.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira pela disponibilidade e ajuda com a identificação de proteínas.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia que contribuíram para a construção do meu conhecimento.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente os funcionários da secretaria e almoxarifado.

Aos funcionários, Pablo, Sr. Cesário, José Carlos, Jaqueline e Regina pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia pela ajuda com as análises no microscópio confocal.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas e ao funcionário Edvaldo pela ajuda nas análises de espectrometria de massa e sequenciamento automático.

Aos amigos do Laboratório de Anaeróbios, Genética de Micro-organismos, Micorrizas e Microbiologia Industrial, por me cederem espaço para realização de parte de meus experimentos e pela convivência agradável.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Anaeróbios, pela maravilhosa convivência e pelo carinho.

À Adriana, Alexandra, Ana Íris, Camila, Emilene, Gardênia, Guilherme, Margarete e Solimar, pela ajuda nos experimentos.

Ao Natan e Margarete pela ajuda com o abstract.

À Família Santos Leandro, que me acolheu em Viçosa e proporcionou momentos muito agradáveis. Em especial, à querida amiga Adriana, pela grande amizade, paciência e ajuda, seja no laboratório ou na vida pessoal.

A todos os meus queridos amigos e amigas, pelo incentivo, apoio e amizade.

A todos os amigos da graduação, mestrado e doutorado.

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

BIOGRAFIA

ADRIANA DOS REIS PONCE, filha de Antonio Vilela Ponce e Giselda Rodrigues dos Reis Ponce, nasceu em Volta Redonda, Rio de Janeiro, no dia 01 de março de 1982.

Em abril de 2001 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, tornando-se bacharel em Julho de 2005.

Em agosto de 2005 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos, defendendo a dissertação em 15 de agosto de 2007.

Em agosto de 2007 iniciou o Doutorado em Microbiologia Agrícola, na mesma área.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Sistema <i>quorum sensing</i>	3
2.2. <i>Quorum sensing</i> em bactérias gram-negativas	5
2.3. Sistema <i>quorum sensing</i> em <i>Aeromonas</i>	8
2.4. Genes regulados por <i>quorum sensing</i> em <i>Aeromonas</i>	13
3. Material e Métodos	17
3.1. Micro-organismos, condições de cultivo e oligonucleotídeos iniciadores utilizados	17
3.2. Suscetibilidade de <i>A. hydrophila</i> a antibióticos.....	19
3.3. Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de rDNA 16S e <i>ahyI</i> de <i>A. hydrophila</i>	19
3.4. Construção de <i>A. hydrophila</i> mutante incapaz de produzir AHL.....	20
3.4.1. Construção de mutante <i>A. hydrophila</i> Δ <i>ahyI</i> utilizando o vetor suicida pKNG101	21
3.4.2. Construção de mutante Δ <i>ahyI</i> utilizando produto de PCR e sistema λ <i>red</i> recombinase.....	24
3.4.3. Construção de <i>A. hydrophila</i> mutante Δ <i>ahyRI</i> , utilizando vetor suicida pSUP 202	24
3.5. Estabilidade das estirpes de <i>A. hydrophila</i> mutantes com sistema <i>quorum sensing</i> comprometido	26
3.6. Confirmação do gênero <i>Aeromonas</i> por rDNA16S, da interrupção do gene <i>ahyI</i> nas estirpes mutantes e avaliação da transcrição dos genes <i>ahyI</i> e <i>ahyR</i>	26
3.7. Avaliação da produção de AHLs por <i>A. hydrophila</i> selvagem e mutantes.....	28

3.8.	Avaliação de atividade proteolítica.....	28
3.9.	Avaliação das atividades amilolítica, hemolítica e lipolítica.....	31
3.10.	Avaliação da motilidade	31
3.11.	Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável	32
3.12.	Eletroforese e sequenciamento de proteínas	33
4.	Resultados e Discussão	35
4.1.	Suscetibilidade de <i>A. hydrophila</i> a antibióticos.....	35
4.2.	Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de rDNA 16S e <i>ahyI</i> de <i>A. hydrophila</i>	35
4.3.	Construção de <i>A. hydrophila</i> mutante incapaz de produzir AHL.....	37
4.3.1.	Construção de mutante <i>A. hydrophila</i> Δ <i>ahyI</i> utilizando o vetor suicida pKNG101	37
4.3.2.	Construção de <i>A. hydrophila</i> mutante Δ <i>ahyI</i> utilizando produto de PCR e sistema λ <i>red</i> recombinase	41
4.3.3.	Construção de <i>A. hydrophila</i> mutante Δ <i>ahyRI</i> , utilizando vetor suicida pSUP 202	42
4.4.	Estabilidade das estirpes de <i>A. hydrophila</i> mutantes com sistema <i>quorum sensing</i> comprometido	44
4.5.	Confirmação do gênero <i>Aeromonas</i> por rDNA16S e da interrupção do gene <i>ahyI</i> nas estirpes mutantes e avaliação da transcrição dos genes <i>ahyI</i> e <i>ahyR</i>	45
4.6.	Avaliação da produção de AHLs por <i>A. hydrophila</i> selvagem e mutantes.....	51
4.7.	Atividade proteolítica	52
4.8.	Atividades amilolítica, hemolítica e lipolítica	57
4.9.	Avaliação da motilidade	59
4.10.	Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável	60
4.11.	Eletroforese e sequenciamento de proteínas	63
5.	Conclusões	68
6.	Referências Bibliográficas	69
	APÊNDICE	77

LISTA DE ABREVIACÕES

β -gal – β -galactosidase

AHL – Homoserina lactona acilada

AI – Autoindutor

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

C4-AHL – Butanoil-homoserina lactona

C6-AHL – Hexanoil-homoserina lactona

DEPC – Dietilpirocarbonato

LDR 12% - Leite desnatado reconstituído a 12%

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

QS – *Quorum sensing*

TYEP – Meio triptona, extrato de levedura e fosfato

UFC mL⁻¹ – Unidades formadoras de colônias por mililitro

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

Nota – Molécula sinalizadora é mesmo que autoindutor (AI) e, neste trabalho será usada também para indicar homoserina lactona acilada (AHL). Durante o texto, os termos são utilizados como sinônimo.

RESUMO

PONCE, Adriana dos Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Características fenotípicas reguladas por *quorum sensing* em *Aeromonas hydrophila*.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Andrea de Oliveira Barros Ribon, Elza Fernandes de Araújo e Maria Cristina Baracat-Pereira.

As bactérias apresentam um sistema elaborado de comunicação entre células dependente de densidade celular, denominado *quorum sensing*. O conhecimento de fenótipos controlados por esse sistema, como a produção de enzimas hidrolíticas que resultam na deterioração de alimentos, formação de biofilmes e mecanismos de patogenicidade podem contribuir para a elucidação de processos importantes na microbiologia de alimentos e permitir a elaboração de estratégias de controle de patógenos e deterioradores. O objetivo deste trabalho foi determinar fenótipos regulados por *quorum sensing* em *Aeromonas hydrophila*, isolada de leite cru refrigerado. Foram comparadas características fenotípicas, como produção de enzimas hidrolíticas, motilidade, formação de biofilmes e perfil protéico das estirpes selvagens Embrapa 029 e ATCC 7966 de *A. hydrophila* mutantes incapazes de sintetizar homoserina lactonas aciladas (AHLs), moléculas sinal do sistema *quorum sensing*. Os mutantes de *A. hydrophila* foram construídos utilizando a estratégia de mutação sítio dirigida, pela interrupção do gene *ahyI* com o gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase, utilizando o vetor suicida pKNG101. Os mutantes 029-8, 029-14 e 029-21, comprovadamente apresentaram o sistema *quorum sensing* comprometido e não foram capazes de produzir AHL detectáveis pelo biomonitor *Chromobacterium violaceum* CV026. Entretanto, estes mutantes apresentaram os genes *ahyI* e *ahyR* intactos quando analisados por PCR. Pela técnica de RT-PCR foi constatado que *A. hydrophila* QS 029-14 foi incapaz de transcrever os genes *ahyR* e *ahyI*, o que comprovou a incapacidade de produzir a proteína reguladora de resposta (AhyR) e a sintase de AHL (AhyI). Estes mutantes perderam a capacidade de hidrolisar gelatina e apresentaram perda ou redução da atividade de hidrólise de caseína. A atividade de β -hemólise e a motilidade tipo *swimming*, comumente observada na estirpe selvagem, não foram observadas no mutante *A. hydrophila* QS

029-14, o que indica que estas características estão sob regulação do *quorum sensing*. As estirpes selvagens e mutantes apresentaram atividades das enzimas amilase e lipases. Estirpes selvagens e o mutante QS 029-14 de *A. hydrophila* foram capazes de aderir aos cupons de aço inoxidável imersos em meio TYEP. Entretanto, menor adesão do mutante QS 029-14 foi verificada tanto pela contagem de células sésseis viáveis como pela observação microscópica dos cupons. Este resultado reforça as evidências do envolvimento do mecanismo de *quorum sensing* na regulação da formação de biofilmes nesta espécie. A análise dos sobrenadantes livres de células e de proteínas intracelulares, em gel de poliacrilamida 12 %, evidenciou a expressão diferencial de proteínas extracelulares e intracelulares produzidas pelas estirpes *A. hydrophila* Embrapa 029, ATCC 7966 e *A. hydrophila* mutante QS 029-14, sugerindo que o sistema *quorum sensing* pode estar envolvido na regulação de algumas proteínas extracelulares e intracelulares. A análise de espectrometria de massa e sequenciamento da região amino-terminal de uma banda de proteína presente no sobrenadante extracelular da estirpe mutante QS 029-14 sugerem uma maior expressão de transportador ABC nesta estirpe. Os resultados sugerem que o sistema *quorum sensing* ou o fator ou fatores que regulam a transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR* regulam a expressão de genes responsáveis pela atividade proteolítica, β -hemólise, motilidade, formação de biofilmes e possivelmente de transportadores de membrana em *A. hydrophila*.

ABSTRACT

PONCE, Adriana dos Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2011. **Phenotypics characteristics controlled for quorum sensing in *Aeromonas hydrophila***. Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-Adviser: Andrea de Oliveira Barros Ribon, Elza Fernandes de Araújo and Maria Cristina Baracat-Pereira.

Bacteria have a communication system among cells, dependent on cellular density, called quorum sensing. Knowledge of phenotypes controlled by this system, such as production of hydrolytic enzymes which result in food spoilage, biofilm formation and mechanisms of pathogenicity will contribute to elucidate important processes in food microbiology and development of control strategies for pathogenic and spoilage microorganisms. The aim of this study was to determine the phenotypes regulated by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* isolated from cooled raw milk. Phenotypic characteristics, such as production of the hydrolytic enzymes, motility, biofilm formation and protein profile of *A. hydrophila* ATCC 7966 and Embrapa 029 wild-type strains, and acyl homoserine lactones (AHLs)-deficient mutant were compared. *A. hydrophila* QS mutants were constructed using a site-directed mutagenesis strategy. The *ahyI* gene was interrupted by gentamicin 3-acetyltransferase gene using the suicide vector pKNG101. Mutant bacteria 029-8, 029-14 and 029-21 showed the quorum sensing system compromised and they were not able to produce detectable AHL by the *Chromobacterium violaceum* CV026. However, *A. hydrophila* mutants showed intact *ahyI* and *ahyR* when analyzed by PCR. By RT-PCR technique, *A. hydrophila* mutant strain QS 029-14 was unable to transcribe *ahyI* and *ahyR* genes, which proved the inability to produce the regulatory protein response (AhyR) and AHL synthase (AhyI). These mutants lost the capacity to hydrolyze gelatin and showed losses or reduction of proteolytic activity. Swimming motility and β -hemolysis activity were observed in wild-type strain while these characteristics were absent in *A. hydrophila* QS 029-14. This leads to the indication that these features are under regulation of quorum sensing system. Both wild-type and mutant strains showed amylase and lipase activities. *A. hydrophila* wild-type and its mutant strain QS 029-14 were able to adhere on stainless steel coupons immersed in TYEP broth. The mutant strain QS 029-14 showed a lower

adhesion which was verified by both the viable sessile cells counts and microscopic analysis of the coupons. This result strongly indicates the role of quorum sensing mechanism in the regulation of biofilm formation in this species. Polyacrylamide gel analysis of cell-free supernatants and intracellular proteins showed a differential expression of intracellular and extracellular proteins produced by *A. hydrophila* ATCC 7966 and Embrapa 029 wild-type strains and *A. hydrophila* 029-14 mutant strain. These data leads to the indication that quorum sensing system might be involved in the regulation of some extracellular and intracellular proteins. The mass spectrometry analysis and sequencing of the amino-terminal region of the protein band present in the extracellular supernatant of the mutant strain QS 029-14 suggest an increased expression of ABC-type transporter. These results suggest that the quorum sensing system or the factor or factors related to the transcription of genes *ahyI* and *ahyR* regulate the expression of genes responsible for the proteolytic activity, β -hemolysis, motility and biofilm formation in *A. hydrophila*.

1. Introdução

Aeromonas hydrophila é um reconhecido patógeno gram-negativo capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo animais aquáticos, terrestres e o homem. É amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado em água e alimentos como carnes, peixes, produtos lácteos e vegetais. Além disso, *A. hydrophila* é encontrado em leite cru refrigerado e sua característica psicrotrófica, com capacidade de multiplicação em alimentos refrigerados, associada à atividade proteolítica, o torna um importante agente de deterioração de alimentos como carnes e lácteos.

Compreender a regulação de mecanismos de patogenicidade e de fenótipos que resultam na deterioração de alimentos, como a produção de enzimas hidrolíticas e formação de biofilmes é importante para se elaborar estratégias de controle de micro-organismos indesejáveis por meio de bloqueio dos sistemas de comunicação. Em *A. hydrophila*, assim como em muitas bactérias gram-negativas, é reconhecido o sistema de regulação da expressão gênica em resposta a concentração celular denominado de *quorum sensing* (QS) e mediado por moléculas sinalizadoras *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) produzidas e liberadas no meio ambiente. O sistema QS é o fenômeno pelo qual a bactéria regula a sua expressão gênica em resposta a concentração de moléculas sinais difusíveis produzidas e liberadas no meio ambiente local. *A. hydrophila* possui os genes homólogos de *luxRI*, denominados *ahyRI* e relacionados com a síntese do regulador de resposta e do gerador de sinal conhecido como autoindutor 1 (AI-1), que são moléculas de AHLs. A presença do gene *luxS*, responsável pela síntese de outra molécula sinal, conhecida como autoindutor 2 (AI-2), também foi observada em *A. hydrophila*.

Diversos fenótipos regulados por *quorum sensing* mediado por AI-1 em *A. hydrophila* foram determinados, incluindo atividade proteolítica, formação de biofilmes e expressão de fatores de virulência. O AI-2 parece regular a formação de biofilmes, motilidade e virulência neste micro-organismo.

O conhecimento do sistema *quorum sensing* em bactérias é interessante e importante, pois se busca elucidar quando e como a comunicação celular está envolvida na deterioração de alimentos, patogenicidade e formação de biofilmes. Esse conhecimento pode ser útil no desenvolvimento de estratégias específicas para o bloqueio de sistemas de comunicação e controlar fenótipos de interesse.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do sistema *quorum sensing* na regulação da produção de enzimas hidrolíticas, formação de biofilmes, expressão de proteínas e na atividade hemolítica de *A. hydrophila*, isolada de leite cru refrigerado.

2. Revisão de literatura

2.1. Sistema *quorum sensing*

Por um longo tempo, acreditava-se que as bactérias existiam como células individuais, que buscavam nutrientes e se multiplicavam, sendo estudadas como organismos que agem de forma independente. Entretanto, bactérias empregam sofisticados mecanismos de regulação genética e modificam seu comportamento em função de informações que se originam do ambiente, de animais, de plantas hospedeiras e de outras bactérias (FUQUA et al., 1996; PLATT e FUQUA, 2010). Este fenômeno indica a existência de interação e comunicação entre as células. As bactérias podem produzir um extenso repertório de metabólitos secundários e podem responder a uma ampla variedade de moléculas químicas presentes no ambiente. O fenômeno pelo qual uma bactéria regula a sua expressão gênica em resposta a concentração de sinais difusíveis produzidos e liberados no meio ambiente local é denominado *quorum sensing* (FUQUA et al., 1996).

Ao longo dos anos, desde a sua introdução como um sistema dependente de densidade celular, o uso do termo *quorum sensing* evoluiu para se tornar a descrição geral do processo de produção de sinalização e de resposta em nível de expressão dos genes. Entretanto, muitos fatores bióticos e abióticos podem influenciar os gradientes químicos destas moléculas sinalizadoras. Estes fatores incluem a distribuição espacial de células produtoras de moléculas sinalizadoras, a taxa em que a molécula sinalizadora é produzida e difundida e a estabilidade da molécula sinal. Isso tem levado a proposição de novos termos, incluindo *diffusion sensing*, *confinement-induced QS* e *efficiency sensing*, para descrever estes processos genéticos e bioquímicos. Estes novos nomes enfatizam diferentes funções adaptativas da regulação pelo sistema *quorum sensing*, relacionados a um subconjunto específico de fatores que influenciam a concentração de molécula sinal no ambiente. Entretanto, o uso de um termo diferente para cada função adaptativa pode confundir o entendimento do processo de *quorum sensing* ao

invés de esclarecê-lo. Sendo assim, é importante lembrar que o contexto ecológico da regulação por *quorum sensing*, assim como o próprio processo, é complexo e influenciado por múltiplos aspectos dos ambientes naturais (PLATT e FUQUA, 2010). As moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* são quimicamente diversas, e muitas bactérias sintetizam e utilizam múltiplas moléculas sinalizadoras de uma mesma ou de diferentes classes que constituem uma hierarquia regulatória (WILLIAMS, 2007).

O sistema de sinalização *quorum sensing* já foi identificado em muitos gêneros de bactérias. Nesse processo, a bactéria é capaz de monitorar a presença de outras bactérias ao seu redor pela produção e resposta a moléculas sinalizadoras, que são compostos de baixa massa molecular liberados no ambiente, conhecidos como autoindutores ou molécula AI (TAGA e BASSLER, 2003). Quando uma concentração crítica de autoindutores é atingida, o micro-organismo detecta que um número suficiente ou um *quorum* de bactérias está presente e responde com a expressão coordenada de certos genes. Os sinais são enviados a uma região promotora particular, que ativa ou reprime genes-alvos, e permite ao micro-organismo organizar uma resposta unificada favorável à sobrevivência da população (DE KIEVIT e IGLEWSKI, 2000; SWIFT et al., 2001; SMITH et al., 2004). O sistema *quorum sensing* facilita o acesso a nutrientes complexos ou a nichos no ambiente, propicia defesa coletiva contra outros micro-organismos competidores ou contra mecanismos de defesa do hospedeiro eucarioto, além de otimizar a sobrevivência da população por meio da diferenciação em formas morfológicas melhor adaptadas para combater ameaças ambientais (SWIFT et al., 2001; WILLIAMS, 2007).

Em sua maioria, as moléculas sinalizadoras são de natureza orgânica e de baixo peso molecular (<1000 Da) ou pequenos peptídeos com cinco a 20 aminoácidos (WILLIAMS, 2007). As bactérias gram-negativas utilizam principalmente *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs), derivadas de precursores de ácidos graxos e aminoácidos, também conhecidas com AI-1 (FUQUA et al., 2001; MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD et al., 2001). As AHLs constituem a família mais bem caracterizada de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*. Mais de 12 derivados de AHLs, com variações no comprimento ou substituição da cadeia acil foram identificados em uma gama de bactérias gram-negativas (WHITEHEAD et al., 2001). Além disso, as bactérias gram-negativas podem

utilizar 2-alkil-4-quinolonas (AQs), ácidos graxos de cadeia longa e ésteres metílicos de ácidos graxos, bem como autoindutor-2 (AI-2), uma molécula de furanosil borato diéster (WILLIAMS, 2007). AI-2 também é produzido por algumas bactérias gram-positivas, embora geralmente estes micro-organismos utilizem, como molécula sinal, peptídeos lineares, cíclicos ou modificados (MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD et al., 2001), como os peptídeos autoindutores (AIPs), produzidos por bactérias do gênero *Staphylococcus* (WILLIAMS, 2007). O autoindutor 3 (AI-3) está envolvido na comunicação cruzada entre *Escherichia coli* O157:H7 e epinefrina do sistema sinalizador da célula do hospedeiro (SPERANDIO et al., 2003) e sua estrutura química ainda não foi elucidada. Além dessas, outras moléculas estão envolvidas na sinalização célula-célula, entre elas, dipeptídeos cíclicos, como dicetopiperazinas (DKPs) (HOLDEM et al., 1999; DEGRASSI et al., 2002), 2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona (PQS), que atuam como uma ligação adicional regulatória entre os circuitos de *quorum sensing* Las e Rhl em *Pseudomonas aeruginosa* (PESCI et al., 1999), e ácido 3-hidroximetil éster palmítico (3OH PAME) (FLAVIER et al., 1997). As γ -butirolactonas, tal como o fator A, moléculas autoindutoras estruturalmente relacionadas às AHLs, são sintetizadas por estreptomicetos (WILLIAMS, 2007).

Estudos mostram que o *quorum sensing* regula uma série de fenótipos, incluindo a produção de antibióticos, formação de biofilmes, bioluminescência, diferenciação celular, competência, produção de pigmentos e metabólitos secundários, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, esporulação, motilidade em superfícies, produção de toxinas e expressão de genes de virulência (SMITH et al., 2004; DIGGLE, CRUSZ e CÁMARA, 2007).

2.2. *Quorum sensing* em bactérias gram-negativas

Diversos gêneros de bactérias gram-negativas já foram identificados como produtores de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing*. Dentre estes, destacam-se importantes patógenos, como espécies de *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, entre outras.

Muitos sistemas *quorum sensing* foram descritos em espécies do gênero *Salmonella*, que sintetizam um homólogo a LuxR, denominado de SdiA, mas não produzem uma proteína homóloga a LuxI e, portanto, não sintetizam AHLs (WALTERS e SPERANDIO, 2006). Entretanto, há indícios de que a proteína SdiA responda a AHLs produzidas por outras espécies bacterianas (MICHAEL et al., 2001) e sendo assim, esse patógeno é capaz detectar AHLs produzidas por outras bactérias intestinais. Em *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium, o gene *luxS* está diretamente envolvido na síntese do AI-2. Foi demonstrado que *luxS* e o AI-2, 4,5-dihidroxi 2,3 pentanedione (DPD), são necessários para a virulência desta estirpe (CHOI et al., 2007). Neste contexto, um mutante sem o gene *luxS* apresentou expressão atenuada do gene *invF* e, conseqüentemente, dos genes alvos da Ilha de Patogenicidade 1 (SPI-1), *sicA*, *sigD* e *sopE* (CHOI et al., 2007). Estes genes são necessários para a eficiente invasão das células do epitélio intestinal. *Salmonella* pode assegurar o processo de infecção inicial apenas pela produção de fatores de virulência da SPI-1 (CHOI et al., 2007). Além desses dois sistemas de *quorum sensing*, *Salmonella* responde a outras duas classes de sinais, a primeira corresponde aos AIs aromáticos (AI-3) produzidos pela microbiota gastrointestinal normal e a segunda são hormônios da classe catecolamina, em particular epinefrina/norepinefrina produzidos pelo hospedeiro (SPERANDIO et al., 2003).

Escherichia coli patogênica apresenta sistema *quorum sensing* semelhante ao de *Salmonella*, tais como SdiA, *luxS*/AI-2, AI-3/epinefrina/norepinefrina e indol para mediar a sinalização celular. A maioria destes sistemas de sinalização está envolvida na comunicação interespecíes e o sistema AI-3 / adrenalina / noradrenalina está envolvido na comunicação entre reinos. Pelo fato de residir no trato gastrointestinal, um ambiente que abriga uma alta densidade e diversidade de espécies bacterianas, não é surpreendente que *E. coli* seja capaz de se comunicar por diversos sistemas como uma forma de se adaptar a este ambiente (WALTERS e SPERANDIO, 2006). Estudo realizado por Sperandio e colaboradores (2001) revelou que a inibição da expressão do gene *sdiA* leva a uma diminuição da expressão do gene *ftsQ2p* envolvido nos eventos de divisão celular, indicando que a comunicação célula-célula pode ter função importante nestes eventos. Estudos mostraram que AI-2 em *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) aumenta a quimiotaxia, motilidade tipo *swimming* e adesão a células HeLa (BANSAL et al.,

2008). Além disso, a exposição a AI-2 alterou a expressão de 23 genes no *locus* LEE (*locus of enterocyte effacement*), diretamente envolvidos na produção de determinantes de virulência, bem como de outros genes envolvidos na virulência como, por exemplo, 46 genes que codificam proteína flagelar/fimbrial e 24 genes relacionados ao metabolismo de ferro (BANSAL et al., 2008). Bansal e colaboradores (2007) verificaram que EHEC é atraída por epinefrina/norepinefrina e repelida por indol e que epinefrina e norepinefrina também aumentaram a motilidade e formação de biofilmes de EHEC, enquanto o indol atenuou esses fenótipos. O aumento da expressão de genes envolvidos na colonização de superfície e virulência foi ocasionado por epinefrina/norepinefrina, enquanto a exposição ao indol diminui a expressão desses genes (BANSAL et al., 2007). Esses resultados sugerem que epinefrina/norepinefrina aumentam a infecção de EHEC, enquanto o indol atenua o processo.

Em *Pseudomonas aeruginosa* o sistema *quorum sensing* é sensível a múltiplos autoindutores e a regulação está disposta em sequência (WALTER e BASSLER, 2005). O sistema é formado por dois circuitos chamados, LasIR e RhlIR. Além desses sistemas, *P. aeruginosa* também responde a 2 heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), que parece atuar como um elo entre os sistemas LasIR e RhlIR (JAYARAMAN e WOOD, 2008). O *quorum sensing* é essencial para consolidar a infecção respiratória crônica em pacientes com fibrose cística causada por *P. aeruginosa* por regular a adesão, formação de biofilme e a expressão de fatores de virulência, que permitem a persistência do patógeno nos pulmões e são necessários para a progressão da doença (SMITH e IGLEWSKI, 2003). Os principais reguladores de resposta e fenótipos regulados por *quorum sensing* em *P. aeruginosa* estão apresentados na Tabela 1 (WILLIAMS e CÁMARA, 2009).

Tabela 1 – Principais fenótipos regulados por *quorum sensing* em *P. aeruginosa* e proteínas regulatórias envolvidas.

Regulador	Descrição	Ligação com QS	Fenótipos afetados
VfR	Proteína receptora de AMP cíclico	Em mutante <i>vfR</i> há redução de 90% na expressão de <i>lasR</i>	Exotoxina A e protease
RsaL	Repressor de QS	Repressão direta do gene <i>lasI</i>	Elastase, piocianina, cianeto de hidrogênio
RpoS	Fator sigma de fase estacionária	Regulador negativo da expressão de <i>rhlI</i>	LecA, elastase, piocianina, motilidade <i>swarming</i>
RpoN	Fator sigma alternativo	Regulador negativo de <i>lasRI</i> e <i>rhlI</i> . Pode ser ativador de <i>rhlI</i>	Elastase, ramnolipídio, cianeto de hidrogênio
MvaT	Regulador transcricional HNS-like	Envolvido no crescimento dependente de QS	LecA, elastase, piocianina, motilidade <i>swarming</i> , biofilme, bomba de efluxo MexEF-OprN
VqsM	Regulador transcricional	<i>lasI</i> e <i>rhlI</i> são reprimidos no mutante <i>vqsM</i>	Protease, elastase, motilidade <i>swarming</i> e <i>swimming</i>
RsmA	Regulador pós-transcricional	Controla negativamente <i>lasI</i> e <i>rhlI</i>	Protease, piocianina, LecA, cianeto de hidrogênio, motilidade <i>swarming</i>
DskA	Regulador transcricional	Controla negativamente <i>rhlI</i>	Elastase, ramnolipídio
GacA	Ativador global	Regulador positivo de <i>lasR</i> e <i>rhlR</i>	Piocianina, lipídio, cianeto de hidrogênio
PhoB	Regulador de resposta	Estimulador de <i>rhlR</i> sob condições limitadas de fosfato	Piocianina
PQS	Quinolona sinal de <i>Pseudomonas</i>	Regulador positivo de <i>rhlI</i>	Elastase, piocianina, LecA e formação de biofilme
PmpR	Proteína da família YebC	Repressor de <i>pqsR</i> , <i>pqsR</i> , <i>pqsH</i> e <i>rhlR</i>	Fenazina, piocianina
PtxR	Regulador transcricional	Controla negativamente <i>pqsA-E</i> e <i>rhlI</i> e positivamente <i>lasI</i>	Piocianina, exotoxina A, ramnolipídio
PPK1	Polifosfato quinase	Controla positivamente a produção de AHL	Elastase, ramnolipídio, formação de biofilmes
AlgR	Regulador transcricional	Se liga ao promotor de <i>rhlI</i> e reprime expressão no biofilme	Maturação de biofilmes, ramnolipídio

Modificado de Willians e Cámara, 2009.

2.3. Sistema *quorum sensing* em *Aeromonas*

Aeromonas hydrophila é uma bactéria gram-negativa, aeróbia facultativa, não formadora de esporos, pertencente à família Aeromonadaceae (DASKALOV, 2006). É um patógeno emergente, amplamente distribuído no ambiente. *A. hydrophila* é encontrada em água e em muitos alimentos como peixes, crustáceos, frango e alimentos crus como leite, vegetais e carnes (GOBAT e JEMMI, 1993). Espécies de *Aeromonas* são reconhecidas como patógenos que podem causar, além de gastroenterites, sérias infecções extraintestinais, incluindo bacteremia, meningite e infecções pulmonares e em ferimentos (DASKALOV, 2006). *A.*

hydrophila é um patógeno presente em leite cru refrigerado (ARCURI et al., 2008) e tem atraído atenção, de pesquisadores em função de sua característica psicrotrófica, sendo capaz de multiplicação em alimentos refrigerados.

Infecções bacterianas, causadas por membros móveis do gênero *Aeromonas*, incluindo *A. hydrophila*, estão entre as mais comuns e problemáticas doenças de peixes criados em tanques (CAMUS et al., 1998). *A. hydrophila* causam furunculose nos peixes, com lesão necrótica focal em vários músculos, podendo evoluir para septicemia fatal (RIBEIRO, 2000).

Espécies de *Aeromonas* são capazes de induzir uma grande variedade de estirpes biossensoras de AHLs (SWIFT et al., 1997; MEDINA-MARTINEZ et al., 2006, PINTO et al., 2007). Swift et al. (1997) verificaram que *A. hydrophila* e *Aeromonas salmonicida* possuem os genes homólogos de *luxRI*, relacionados à síntese do gerador de sinal e regulador de resposta denominados *ahyRI* e *asaRI*, respectivamente. Os genes *ahyR* e *asaR* são transcritos de forma inversa a *ahyI* e *asaI*, respectivamente em ambas as espécies de *Aeromonas* (Figura 1 A e 1B).

A principal molécula sinalizadora sintetizada por *AhyI* e *AsaI* foi purificada e identificada, por cromatografia de camada fina, análise de cromatografia líquida de alta pressão e espectrometria de massa, como butanoil-homoserina lactona (C4-AHL) (SWIFT et al. 1997). Adicionalmente, uma segunda molécula, sintetizada em menor concentração foi identificada como hexanoil-homoserina lactona (C6-AHL). Além disso, *AhyR* e C4-AHL são requeridas para a transcrição de *ahyI* em ambas as espécies (SWIFT et al. 1997).

Os genes *ahyI* e *ahyR* contêm promotores divergentes, um divergon, com uma região intergênica de 62 pb (KIRKE et al., 2004) (Figura 2), onde se encontra a região promotora dos dois genes. Esta região intergência contém 12 pb de sequência simétrica análoga ao box *lux* de *Vibrio fischeri* e, portanto, um potencial sítio de ligação para *AhyR*. No entanto, em contraste com o sistema de *V. fischeri*, onde *LuxR* regula a expressão de *luxI* e, portanto, a síntese de AHL, em *A. hydrophila*, mutação no gene *ahyR* não resultou na perda de síntese C4-AHL sendo esta AHL presente na fase estacionária da estirpe selvagem e mutante em *ahyR* (SWIFT et al., 1999).

[illegible]

Figura 1 – Sequências de nucleotídeos e proteínas deduzidas dos homólogos *luxRI* de *A. hydrophila* (**A**; sequências de genes *ahyRI* e proteínas AhyRI são mostradas) e *A. salmonicida* (**B**; sequências de genes *asaRI* e proteínas AsaRI são mostradas). Sítios de restrição e uma região de sequência palindrômica com repetições invertidas, ><, não homólogo a sequência consenso do box *lux* são mostrados (Modificado de Swift et al., 1997).

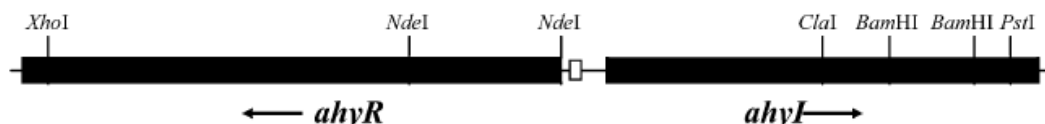


Figura 2 – Organização gênica do locus *ahyRI* (Modificado de KIRKE et al., 2004).

Para definir a regulação de *ahyI* em mais detalhes, Kirke et al. (2004) examinaram a expressão de *ahyI* em função do crescimento, em ambas as estirpes selvagens e no mutante *ahyR⁻*. Eles mapearam o promotor *ahyI* e usaram uma proteína de fusão MalE-AhyR para determinar se AhyR é capaz de se ligar a uma região intergênica entre *ahyR* e *ahyI*. A proteína AhyR não é requerida para a transcrição de *ahyI*, mas parece controlar o tempo de expressão de AhyI e a degradação de AhyI na fase estacionária. Na estirpe selvagem, a proteína AhyI foi detectada no meio da fase exponencial de crescimento, mas degradada no início da fase estacionária, enquanto na estirpe mutante *ahyR⁻*, a produção de AhyI foi atrasada até o final da fase exponencial (4 h), mas mantida na fase estacionária. Utilizando extensão do oligonucleotídeo (RT-PCR e sequenciamento manual), Swift et al. (1999) mapearam o sítio de início da transcrição de *ahyI*, que revelou uma sequência de 12 pb simétrica ao box *lux* presente na região intergênica de *ahyRI* com 62 pb e se sobrepõe com a região -10 do promotor *ahyI*. Ensaios de mudança de mobilidade eletroforética mostraram que MalE-AhyR se liga especificamente a esta sequência. Assim, concluíram que AhyR atua tanto como regulador positivo, como negativo da expressão de *ahyI* e, conseqüentemente, da produção de C4-AHL de maneira dependente da fase estacionária.

O sistema *quorum sensing* em *A. hydrophila* é mediado por C4-AHL e C6-AHL. As AHLs são sintetizadas pela enzima AhyI. Quando a concentração de AHL no meio atinge um valor crítico, a AHL se liga ao regulador de resposta AhyR. O complexo AHL-AhyR ativa a transcrição dos genes alvos como pode ser visualizado na Figura 3 (DEFOIRDT et al., 2005).

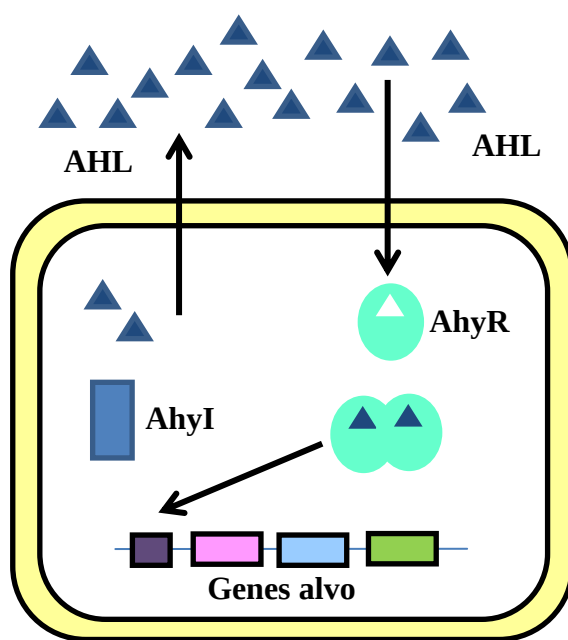


Figura 3 – Sistema *quorum sensing* em *A. hydrophila*. AHL: acil homoserina lactona; AhvI: sintase de AHL; AhvR: proteína reguladora de resposta (Modificado de Defoirdt et al., 2005).

Jangid et al. (2007) avaliaram a presença de homólogos *luxRI* estão universalmente presentes em 73 estirpes de *Aeromonas*, incluindo as espécies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. shubertii*, *A. trota*, *A. allosccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, *A. culicicola* e *A. molluscorum*, obtidas de várias coleções de culturas, amostras clínicas e amostras ambientais. Nesse trabalho foi verificado que das 73 estirpes de *Aeromonas* avaliadas, 71 foram capazes de induzir a resposta mediada por AHL em *Chromobacterium violaceum* CV026, *E. coli* JM109 pSB403 e *E. coli* JM109 pJBA82. Entretanto, análise de hibridização *dot blot* revelou que todas as estirpes avaliadas contem o homólogo *luxRI* e a amplificação e sequenciamento revelam que os genes homólogos a *luxRI* compartilham uma identidade de sequência muito elevada.

A presença de mais dois genes homólogos a *ahvR* no genoma de *A. hydrophila* SSU foi determinada por Kozlova et al. (2011), chamados de *ahvR2* e *ahvR3*. Análises mostraram que o produto do gene *ahvR2* está diretamente ligado ao sistema de secreção do tipo 6 (T6SS), entretanto, a contribuição desses dois

homólogos de *ahyR* ao sistema *quorum sensing* de *A. hydrophila* SSU permanece desconhecida (KOZLOVA et al., 2011).

2.4. Genes regulados por *quorum sensing* em *Aeromonas*

Na literatura há poucos relatos dos genes regulados por *quorum sensing* em *A. hydrophila* e *A. salmonicida*, entretanto, foram descritos fenótipos regulados por *quorum sensing* nessas espécies.

Um processo que pode estar ligado ao sistema *quorum sensing* no gênero *Aeromonas* é a divisão celular. Embora não existam evidências experimentais, estudos moleculares em *A. hydrophila* e *A. salmonicida* (SWIFT et al. 1997) e análise do sistema *quorum sensing* em *A. culicicola* MTCC 3249^T (JANGID et al., 2007) confirmaram que um gene com homologia a *iciA* está presente *downstream* aos homólogos *luxRI*. O *iciA* é um gene de *E. coli* que codifica um inibidor específico da iniciação da replicação cromossomal *in vitro*. A presença de *iciA* no gênero *Aeromonas* claramente implica que a divisão celular pode estar ligada ao sistema *quorum sensing* (JANGID et al., 2007).

Swift et al. (1997) verificaram que o gene *exeC*, que codifica um sistema de secreção do tipo III para a exportação de, por exemplo, serina protease, está localizado a, aproximadamente, 11 kb de *asaI* de *A. salmonicida*. Esse resultado indica uma possível regulação da atividade proteolítica pelo sistema *quorum sensing*. A produção de exoprotease por *A. hydrophila* regulada pelo sistema *quorum sensing* foi avaliada por Swift et al. (1999), que observaram que a inativação do gene *ahyI* no cromossomo de *A. hydrophila*, inibiu a produção de C4-AHL e as atividades de serina protease e metaloprotease nesse mutante foram substancialmente reduzidas. Esses autores verificaram que a adição de C4-AHL exógena restaurou a atividade proteolítica. Adicionalmente, mutação no gene *ahyR* resultou na perda da atividade de ambas as exoproteases, que não foi restaurada por C4-AHL exógena. Além disso, a adição de AHLs com cadeia acil de 10, 12 e 14 carbonos reduziu a produção de exoproteases pela estirpe selvagem.

Lynch et al. (2002) avaliaram a capacidade de *A. hydrophila* AH-1N em formar biofilmes em uma câmara de fluxo contínuo com mutantes isogênicos *ahyI* e *ahyR*. O mutante *ahyI*, que não produz C4-AHL, não foi capaz de formar um biofilme maduro. A alteração na diferenciação do biofilme do mutante *ahyI* foi parcialmente restaurada pela adição de C4-AHL exógena. Não foram observadas diferenças na formação de microcolônias pelo mutante *ahyR* quando comparado à estirpe selvagem e houve um aumento de cerca de 80 % na superfície de cobertura.

Bi, Liu e Lu (2006) inativaram o gene *ahyR* de *A. hydrophila* pela inserção de um fragmento de DNA contendo gene que confere resistência a canamicina. O mutante *ahyR* perdeu a capacidade de hidrolisar algumas substâncias como a maltose, manitol, sacarose e uréia e não foi capaz de utilizar arginina e lisina. Também foi verificada alteração no perfil de proteínas da membrana externa e uma redução da adesão do mutante *ahyR* quando comparado à estirpe selvagem. Além disso, o mutante *ahyR* não produziu quantidades detectáveis de exoproteases, hemolisina, amilase e DNase. Os efeitos citotóxicos do mutante de *A. hydrophila* foram altamente atenuados quando comparados com os da estirpe selvagem.

Khajanchi et al. (2009) avaliaram a função do sistema *quorum sensing*, mediado por AHLs, na virulência de *A. hydrophila* SSU, pela construção de um duplo mutante $\Delta ahyRI$. Eles verificaram que a produção de protease foi reduzida no duplo mutante, quando comparada com a estirpe selvagem. O duplo mutante $\Delta ahyRI$ não foi capaz de expressar o sistema de secreção do tipo VI (T6SS), enquanto a produção e translocação do sistema de secreção do tipo III não foram afetadas. A formação de biofilme em superfície sólida foi significativamente menor no duplo mutante quando comparado à estirpe selvagem. Para avaliar a virulência *in vivo* de *A. hydrophila* SSU, uma dose letal de 3×10^7 UFC mL⁻¹ de *A. hydrophila* SSU selvagem e do duplo mutante foram injetadas em ratos. Após seis dias, 100 % dos ratos infectados com a estirpe selvagem morreram, entretanto, apenas 50 % dos ratos infectados com o duplo mutante $\Delta ahyRI$ morreram após 16 dias de incubação. Esse resultado sugere uma atenuação de virulência pela supressão dos genes *ahyRI* de *A. hydrophila* SSU duplo mutante $\Delta ahyRI$.

Para avaliar a função do sistema *quorum sensing* na virulência e produção de pigmento por *A. salmonicida* subsp. *Achromogenes*, um mutante AsaI foi construído por substituição alélica. A virulência da estirpe mutante AsaI em peixe foi significativamente reduzida, pois foi necessária uma LD₅₀ 20 vezes maior que a requerida para a estirpe selvagem. Além disso, houve uma redução da expressão de dois fatores de virulência, uma protease AsaP1 e um fator citotóxico, e da produção de pigmento marrom no mutante. A produção da protease AsaP1 também foi inibida pelos inibidores sintéticos de *quorum sensing*, (*N*-propilsulfanilacetil)-L-homoserina lactona, (*N*-pentilsulfanilacetil)-L-homoserina lactona e (*N*-heptilsulfanilacetil)-L-homoserina lactona. Assim, os autores concluíram que o sistema *quorum sensing* está relacionado à virulência e produção de pigmento em *A. salmonicida* subsp. *Achromogenes* (SCWENTEIT et al., 2011).

A. hydrophila SSU deficiente na síntese de LuxS, ou seja, incapaz de sintetizar o AI-2, mostrou uma arquitetura e dinâmica da formação de biofilmes alterados, motilidade reduzida e virulência aumentada em ensaio com ratos (KOZOLOVA et al., 2008).

Kozlova et al. (2011) estudaram a ligação entre os sistemas AhyI/AhyR, LuxS/AI-2 e um mensageiro secundário bacteriano, diguanosina monofosfato cíclica (c-di-GMP), na regulação de fatores de virulência em *A. hydrophila* SSU. Para essa avaliação, eles examinam o efeito da superprodução da proteína GGDEF, que aumenta os níveis de c-di-GMP, no fenótipo e transcrição de genes envolvidos na formação de biofilmes e motilidade, na estirpe selvagem e mutantes $\Delta ahyRI$ e *luxS*. Eles verificam que a superprodução de c-di-GMP aumenta a formação de biofilmes e reduz a motilidade da estirpe selvagem, o mesmo comportamento verificado no mutante *luxS*. Em contraste, o mutante $\Delta ahyRI$, superprodutor c-di-GMP, apresentou aumento na formação de biofilmes e nenhum efeito na motilidade, o que sugere estes fenótipos são dependentes dos sistemas *quorum sensing* AI-1 e AI-2.

Em *A. hydrophila* o sistema *quorum sensing* é baseado em genes homólogos a *luxRI* e possui resposta mediada por acil homoserina lactonas, um dos sistemas mais comuns de *quorum sensing* em bactérias gram-negativas. Estudos indicam que fenótipos como atividade proteolítica e formação de biofilmes são regulados por esse sistema em *A. hydrophila*, assim como em

muitos outros gêneros de bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos. O uso de mutantes para o estudo de *quorum sensing* em *A. hydrophila* serve como modelo desse sistema aplicado a outros gêneros de bactérias e também para elucidar quando e como a comunicação celular está envolvida na regulação de fenótipos importantes na patogenicidade e deterioração de alimentos. Esse conhecimento pode ser útil no desenvolvimento de estratégias específicas para o bloqueio destes sistemas de comunicação e controle deste patógeno.

3. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, de Patógenos Alimentares e de Genética de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa - Minas Gerais.

3.1. Micro-organismos, condições de cultivo e oligonucleotídeos iniciadores utilizados

A estirpe de *A. hydrophila* utilizada foi Embrapa 029, isolada de leite cru refrigerado, foi cedida gentilmente pela Embrapa Gado de Leite. As outras estirpes e plasmídeos, utilizados na obtenção dos mutantes, como bioindicadores e controles estão descritos na Tabela 2.

Os estoques das culturas foram feitos em caldo Luria (Himedia, Mumbai, Índia), adicionado de 20 % de glicerol esterilizado, e mantidos a - 80 °C. Antes de cada experimento, as células foram ativadas por duas ativações consecutivas em caldo Luria, com incubação a 30 °C por 18 h, sob agitação.

Para a verificação da produção de AHLs, foi utilizada a estirpe monitora *C. violaceum* CV026, um mutante deficiente na produção de AHL e, consequentemente de violaceína, um pigmento cuja produção é regulada pelo mecanismo de *quorum sensing* (STEINDLER e VENTURI, 2007). O resultado foi considerado positivo para a produção de AHL pela estirpe-teste, quando foi observada a produção de violaceína por *C. violaceum* CV026.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram produzidos pela IDT (Coralville, EUA) e estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2 - Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados

Estirpes	Plasmídeo	Característica relevante	Resistência	Fonte
<i>A. hydrophila</i> Embrapa 016	-	-	-	Arcuri et al. (2008)
<i>A. hydrophila</i> Embrapa 029	-	-	-	Arcuri et al. (2008)
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966*	-	-	-	Cedido pela FIOCRUZ
<i>A. hydrophila</i> 029-8 $ahyI$	-	-	Gentamicina (25 µg mL ⁻¹)	Obtida neste trabalho
<i>A. hydrophila</i> 029-14 $ahyI$	-	-	Gentamicina (25 µg mL ⁻¹)	Obtida neste trabalho
<i>A. hydrophila</i> 029-21 $ahyI$	-	-	Gentamicina (25 µg mL ⁻¹)	Obtida neste trabalho
<i>E. coli</i> XL1-Blue	pMLBAD- <i>aiiA</i> -Gm	Doadora	Gentamicina (25 µg mL ⁻¹)	Martins (2007)
<i>E. coli</i> BW25141	pKD78	-	Cloranfenicol (100 µg mL ⁻¹)	Coli Genetic Stock Center
<i>E. coli</i> BW25141	pKD199	-	Tetraciclina (20 µg mL ⁻¹)	Coli Genetic Stock Center
<i>E. coli</i> S10 λpir	pKNG101	Doadora	Estreptomicina	Cedido pela Universidade de Cornell - EUA
<i>E. coli</i> S10 λpir	pSUP202	-	Ampicilina (100 µg mL ⁻¹) Tetraciclina (20 µg mL ⁻¹) Cloranfenicol (100 µg mL ⁻¹)	Cedido pela Universidade de Cornell - EUA
<i>E. coli</i> S10 λpir	-	Doadora	-	Cedido pela Universidade de Cornell - EUA
<i>E. coli</i> DH5α	pBR322	-	Ampicilina (100 µg mL ⁻¹) e Tetraciclina (20 µg mL ⁻¹)	Cedido pelo Laboratório de Genética de Microorganismos - UFV
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	-	Monitora	Canamicina (20 µg mL ⁻¹)	Laboratório de Microbiologia de Alimentos - UFV

*ATCC – American Type Culture Collection

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo

Nome	Sequência*	Tamanho do amplicon (pb)
<i>rDNA16S</i> F	5' AGG TTG ATG CCT AAT ACG TA 3'	650
<i>rDNA16S</i> R	5' CGT GCT GGC AAC AAA GGA CAG 3'	650
<i>ahyI-XbaI</i> D	5' ATT <u>TCT AGA</u> GTT CGC GCG CCT CGT 3'	577
<i>ahyI-SaII</i> R	5' ATT <u>GTC GAC</u> CCC AGA TGG GAG GTA 3'	577
<i>gem-ClaI</i> D	5' ATT <u>ATC GAT</u> GAA CCT GAA TCG CCA GCG G 3'	872
<i>gem-ClaI</i> R	5' ATT <u>ATC GAT</u> GTT GAA CGA ATT GTT AGG TGG C 3'	872
<i>ahyR-C/PstI</i>	5' GGG <u>CGT GAG</u> TTA TTG CAT CAG CTT GG 3'	783
<i>ahyR-N/ScaI</i>	5' GGG <u>AGT ACT</u> AAA CAA GAC CAA CT 3'	783
<i>ahyRI-C/ScaI</i>	5' GGG <u>AGT ACT</u> ATG AAC CGT CCA GCA GA 3'	1972
<i>ahyRI-N/EcoRI</i>	5' GGG <u>GAA TTC</u> AGC AGC TTG TAA TCC AA 3'	1972

* As sequências sublinhadas correspondem aos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição

3.2. Suscetibilidade de *A. hydrophila* a antibióticos

A determinação do perfil de resistência a antibióticos foi feita cultivando *A. hydrophila* Embrapa 029 em 5 mL de caldo Luria acrescido de 25, 50 e 100 µg mL⁻¹ dos antibióticos ampicilina, estreptomicina e gentamicina. A incubação foi a 30 °C por até 48 h.

3.3. Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de rDNA 16S e *ahyI* de *A. hydrophila*

O DNA total das estirpes de *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 foi extraído utilizando kit *Wizard Genomic DNA Purifications* (Promega, Madison, EUA). Após a extração, o DNA total foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Promega, Madison, EUA) corado com brometo de etídio e observado no foto documentador EagleyeTM (Stratagene®).

Para a amplificação de rDNA 16S de *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 foram utilizados os oligonucleotídeos *rDNA16S* F e *rDNA16S* R (Tabela 3) (BI, LIU e LU, 2007). A amplificação foi realizada em termociclador modelo PTC-100 (MJ. Research Inc. Massachusetts, USA) conforme descrito por Bi, Liu e Lu, (2007). O amplicon foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 % para a análise da integridade e inferência da concentração a partir do uso de marcadores de concentração. Antes do sequenciamento, o produto de PCR foi tratado com EXOSAP-IT[®] (Promega, Madison, EUA). O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genômica - BIOAGRO - UFV e as sequências foram analisadas no programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (ALTSCHUL et al., 1990).

O gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e da estirpe ATCC 7966 foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos *ahyI-XbaI* D e *ahyI-SalI* R. A reação de PCR foi preparada utilizando GoTaq[®] Green Master Mix (M7122) (Promega, Madison, EUA), conforme descrito pelo fabricante. A amplificação foi realizada em aparelho termociclador modelo PTC-100. O ciclo de amplificação consistiu de

uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos oligonucleotídeos a 58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Posteriormente, foi realizada uma última etapa de extensão a 72 °C por 7 min. O amplicon foi submetido à eletroforese em gel de 1,5 % de agarose e a banda do fragmento correspondente ao gene *ahyI* foi purificada utilizando o kit *Wizard® clean-up system* (A7280) (Promega, Madison, EUA). O gene *ahyI* purificado foi quantificado e armazenado a - 20 °C para uso posterior. A clonagem do gene *ahyI* em vetor pGEM-T Easy (3015 pb) (Promega, Madison, EUA) foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Esta construção foi utilizada para transformar *E. coli* DH5α ultra competente por choque térmico (INOUE et al., 1990). Os transformantes foram selecionados em ágar Luria contendo 40 µg mL⁻¹ de X-Gal e 50 µg mL⁻¹ de ampicilina. Cerca de 40 colônias brancas, que receberam o vetor pGEM contendo o gene *ahyI*, e quatro colônias azuis, que receberam apenas o vetor pGEM, foram selecionadas e submetidas à técnica de lise rápida para verificar a presença do vetor pGEM-T Easy contendo o gene *ahyI*. As estirpes identificadas como contendo pGEM-T Easy *ahyI* foram cultivadas em caldo Luria acrescido de 50 µg mL⁻¹ ampicilina e o vetor extraído utilizando o kit *Gene Jet™ Plasmid Miniprep* (Fermentas Life Sciences, Canadá). Para a confirmação da clonagem do gene *ahyI* no vetor pGEM-T Easy, foi realizada a clivagem do vetor com a enzima *EcoRI*. O sequenciamento de *ahyI* presente no vetor foi realizado pela empresa MacroGen (Coreia) e as sequências foram analisadas no programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (ALTSCHUL et al., 1990).

3.4. Construção de *A. hydrophila* mutante incapaz de produzir AHL

Para a construção de mutantes incapazes de produzir AHL, três estratégias foram utilizadas: a obtenção de mutantes pela interrupção do gene *ahyI* com o gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase, utilizando vetor suicida pKNG101; utilizando o sistema λ *red* recombinase (DATSENKO e WANNER 2000) e a obtenção de duplo mutante Δ *ahyRI* utilizando o vetor suicida pSUP202 (KHAJANCHI et al., 2009).

3.4.1. Construção de mutante *A. hydrophila* Δ *ahyI* utilizando o vetor suicida pKNG101

A construção de mutantes incapazes de produzir AHL, pela interrupção do gene Δ *ahyI* com Gm^r , foi realizada de acordo com Swift et al. (1999), com modificações.

O gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 foi amplificado por PCR, utilizando os oligonucleotídeos *ahyI*-*XbaI* D e *ahyI*-*SalI* R (Tabela 3). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de 1,5 % de agarose e a banda correspondente ao gene *ahyI* foi purificada do gel com kit Wizard® *clean-up system*. O gene purificado foi clivado com as enzimas de restrição *SalI* (Promega, Madison, EUA) e *XbaI* (Promega, Madison, EUA) e posteriormente ligado ao vetor pUC18 (Fermentas Life Sciences, Canada) também clivado com *SalI* e *XbaI*. O vetor pUC18 contendo o gene *ahyI* foi transformado na estirpe *E. coli* DH5 α ultra competente por choque térmico (INOUE et al., 1990). Os transformantes foram selecionados em ágar Luria contendo 40 μ g mL⁻¹ de X-Gal e 50 μ g mL⁻¹ de ampicilina. Cerca de 20 colônias que receberam o vetor contendo o gene *ahyI* e cinco colônias, que receberam apenas o vetor pUC18, foram selecionadas e submetidas à técnica de lise rápida para confirmação dos isolados que receberam o vetor pUC18 contendo gene *ahyI*. Em seguida, o vetor foi extraído utilizando o kit *Gene Jet*TM *Plasmid Miniprep* (Fermentas Life Sciences, Canadá).

Para a interrupção do gene *ahyI* contido no vetor pUC18, o gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase contida no vetor pMLBAD-*aiiA*- Gm^r (MARTINS, 2007) foi amplificado pela técnica de PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos *gem*-*ClaI* D e *gem*-*ClaI* R (Tabela 3). Para a reação de amplificação foi utilizado termociclador PTC-100 e o ciclo de amplificação foi determinado conforme descrito no item 3.3. O amplicon foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% e a banda do gel correspondente ao gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase foi purificada utilizando o kit Wizard® *clean-up system*. O gene purificado foi clivado com a enzima de restrição *ClaI* (Promega, Madison, EUA) e submetido à ligação ao vetor pUC18 contendo gene *ahyI* também clivado com *ClaI*. Em seguida, a construção foi

transformada em *E. coli* DH5 α ultra competente por choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). Os transformantes foram selecionados em ágar Luria contendo 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. Em seguida, o vetor foi extraído utilizando o kit *Gene JetTM Plasmid Miniprep* (Fermentas Life Sciences, Canadá). A confirmação da construção foi obtida por PCR, utilizando as mesmas condições para amplificação do gene que codifica gentamicina-3-acetiltransferase, utilizando oligonucleotídeos iniciadores da Tabela 3, e por meio de clivagem do DNA plasmidial com enzima de restrição *SalI* e *XbaI* seguida por eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio.

A construção *ahyI::Gm^r* foi liberada do vetor pUC18 pela clivagem com as enzimas de restrição *SalI* e *XbaI* e ligada ao vetor suicida pKNG101 também clivado com as mesmas enzimas. O vetor pKNG101 contendo *ahyI::Gm^r* foi utilizado para transformar *E. coli* SM10 λ pir por choque térmico. Os transformantes foram selecionados em ágar Luria contendo 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. Em seguida, o vetor pKNG101 contendo *ahyI::Gm^r* foi extraído da estirpe *E. coli* SM10 λ pir utilizando o kit *Pure YieldTM Plasmid Miniprep System* (A1222) (Promega, Madison, EUA). Após a extração, a preparação contendo o vetor foi aplicada em gel de agarose 0,8% e submetida à eletroforese, para a confirmação da presença da construção e quantificação do vetor. A confirmação da construção também foi feita por PCR, utilizando as mesmas condições para amplificação do gene *ahyI* e por meio de clivagem do DNA plasmidial com enzima de restrição *SalI* e *XbaI* seguida por eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

A construção pKNG101 *ahyI::Gm^r* foi inserida em *A. hydrophila* Embrapa 029 por duas maneiras: transformação por eletroporação e transformação por choque térmico.

Para a transformação por eletroporação, as células de *A. hydrophila* Embrapa 029 eletrocompetentes foram preparadas e estocadas conforme descrito por Fengqing e Song (2005). A 40 μL de células eletrocompetentes, contendo aproximadamente 10^8 UFC, foram adicionados cerca de 100 ng da construção e, posteriormente, a mistura foi submetida à eletroporação em cubeta de 0,1 cm, sob 25 μF de capacitância e resistência de 200 Ω , segundo recomendações do fabricante (Bio Rad, EUA). As células foram ressuspensas em 400 μL de meio SOC (SAMBROOK, 1989) e incubadas a 30 °C por até 24 h antes do plaqueamento em meio ágar amido sais biliares verde brilhante (Himedia,

Mumbai, Índia) acrescido de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina para a seleção dos transformantes.

Quando utilizada a transformação por choque térmico, as células foram preparadas, cultivando *A. hydrophila* Embrapa 029 em 250 mL de caldo LB a 30 °C/ 150 rpm até o início da fase logarítmica ou D.O. 0,4. Posteriormente, as células foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas a 4000 *g* por 15 min. Em seguida, as células foram ressuspensas em 30 mL de solução de 0,1 M de MgCl_2 contendo 10 % de glicerol, resfriada a - 4 °C, e incubadas em gelo por 2 h. Após este período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 2,5 mL de solução de 0,1 M de MgCl_2 contendo 10 % de glicerol resfriada a - 4 °C. Aliquotas de 200 μL foram adicionadas a tubos tipo *eppendorf* e armazenadas a - 80 °C até a utilização. Para a transformação por choque térmico, 200 μL de células de *A. hydrophila* Embrapa 029 competentes foram descongeladas em gelo por 30 min. Posteriormente, uma alíquota de 50 ng do vetor pKNG101 contendo *ahyI*:: Gm^r foi adicionada às células e mantidas em gelo por 20 min. A mistura foi submetida a choque térmico de 42 °C por 1 min. As células foram ressuspensas em 600 μL de meio SOC (SAMBROOK, 1989) e incubadas a 30 °C por até 24 h antes do plaqueamento em ágar Luria acrescido de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina para a seleção dos transformantes.

A confirmação da deficiência da síntese de AHL pelo mutante de *A. hydrophila* foi obtida por bioensaio de estria cruzada (STEIDLE et al., 2001) em 1,2 % de ágar Luria, utilizando a monitora *C. violaceum* CV026. As placas foram incubadas a 30 °C por até 48 h para se verificar a produção de violaceína.

A seleção dos transformantes em que ocorreu a dupla recombinação foi feita em ágar Luria acrescido de 5 % e 15 % de sacarose por até 48 h de incubação a 30 °C. O gene *sacAB*, presente no vetor suicida pKNG101, codifica uma levana sacarase capaz de polimerizar o levano, um produto do catabolismo de sacarose, que é tóxico para bactérias gram-negativas (KANIGA, DELOR e CORNELIS, 1991). Assim, o crescimento na presença de sacarose indica que o vetor não está integrado ao genoma, facilitando a identificação do evento de recombinação dupla.

3.4.2. Construção de mutante $\Delta ahyI$ utilizando produto de PCR e sistema λ *red* recombinase

A construção de mutantes incapazes de produzir AHL, com o produto de PCR e sistema λ *red*, foi realizada de acordo com Datsenko e Wanner (2000), com modificações.

Os vetores utilizados, pKD 78 (Tabela 2) e pKD 119 (Tabela 2), são derivados do vetor de baixo número de cópias pKD 46, com origem de replicação oriR101, que requer proteína Pir, origem de replicação sensível à temperatura, repA101ts, os três genes λ *red*: γ , β e *exo* cujo promotor é induzido por L-arabinose, o gene *ara C*, o terminador TL3 após o gene *exo*, além de genes que conferem resistência ao cloranfenicol e tetraciclina, respectivamente. O inserto *ahyI*::Gm^r foi construído conforme descrito no item 3.4.1.

3.4.3. Construção de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyRI$, utilizando vetor suicida pSUP 202

Os genes *ahyRI* de *A. hydrophila* Embrapa 029, foram amplificados por PCR, utilizando os oligonucleotídeos *ahyI*-*XbaI* D e *ahyR*-*PstI* C (Tabela 3). O ciclo de amplificação foi realizado conforme descrito no item 3.3, com exceção do tempo de extensão, que foi de 2 min. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 % e a banda correspondente ao gene *ahyRI* (1458 pb) foi purificada do gel com kit Wizard® *clean-up system*. O gene purificado foi clivado com a enzima de restrição *PstII* (Promega, Madison, EUA). Posteriormente, *ahyRI* (1422 pb) foi ligado ao vetor pUC18 (Fermentas Life Sciences, Canada) também clivado com *PstII*. O vetor pUC18 contendo o gene *ahyRI* foi transformado na estirpe *E. coli* DH5 α ultra competente por choque térmico (INOUE et al., 1990). Os transformantes foram selecionados em ágar Luria contendo 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de X-Gal e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. Cerca de 20 colônias que receberam o vetor contendo o gene *ahyRI* e cinco colônias, que receberam apenas o vetor pUC18, foram selecionadas e submetidas à técnica de

lise rápida para confirmação da presença do vetor pUC18 contendo gene *ahyRI*. Em seguida, o vetor foi extraído utilizando o kit *Pure Yield™ Plasmid Miniprep System*.

Para a remoção da região promotora e início da região codificadora dos genes *ahyR* e *ahyI*, o vetor pUC18 *ahyRI* foi clivado com a enzima *StuI*, o que ocasionou a remoção de 441 pb de *ahyRI*, gerando Δ *ahyRI*. Posteriormente, o vetor foi ligado e transformado em *E. coli* DH5 α ultra competente por choque térmico (INOUE et al., 1990). Os transformantes foram selecionados, checados por lise rápida, e extraídos por kit *Pure Yield™ Plasmid Miniprep System* e clivados com a enzima de restrição *ClaI* para posterior inserção do gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetiltransferase (Gm^r) na posição 719 pb de Δ *ahyRI*. O gene Gm^r foi amplificado, purificado e clivado conforme descrito no item 2.2.5. Em seguida, o gene Gm^r foi ligado à construção pUC18 Δ *ahyRI* e a construção foi transformada em *E. coli* DH5 α ultra competente por choque térmico (INOUE et al., 1990). Os transformantes foram selecionados em ágar Luria contendo 25 μ g mL⁻¹ de gentamicina. Em seguida, o vetor foi extraído utilizando o kit *Pure Yield™ Plasmid Miniprep System*.

A construção Δ *ahyRI*- Gm^r foi liberada do vetor pUC18 pela clivagem com a enzima de restrição *PstI* e ligada ao vetor suicida pSUP202 clivado com a mesma enzima. O vetor pSUP202 Δ *ahyRI*- Gm^r foi transformado em *E. coli* SM10 λ pir por choque térmico. Os transformantes foram selecionados em ágar Luria contendo 25 μ g mL⁻¹ de gentamicina. Em seguida, o vetor pSUP202 Δ *ahyRI*- Gm^r foi extraído da estirpe *E. coli* SM10 λ pir utilizando o kit *Pure Yield™ Plasmid Miniprep System*. Após a extração, o vetor foi aplicado em gel de agarose 0,8% e submetido à eletroforese, para a confirmação da presença da construção e quantificação do vetor.

O vetor pSUP202 Δ *ahyRI*- Gm^r foi inserido em *A. hydrophila* Embrapa 029 por eletroporação (FENGQING e SONG, 2005) e conjugação (protocolo fornecido pelo laboratório do Dr. Steve C. Winans - Cornell University), e os mutantes foram selecionados em ágar Luria acrescido de estreptomicina e gentamicina, conforme descrito no item 3.5.1. A confirmação da mutação foi feita pela avaliação da incapacidade de produzir AHL, por ensaio de estrias cruzadas, conforme descrito no item 3.5.1 e pela presença da construção Δ *ahyRI*- Gm^r no genoma dos mutantes por PCR utilizando os oligonucleotídeos *ahyR-C/PstI* e

gem-ClaI D (Tabela 3). A perda do vetor pSUP202 Δ *ahyRI*-Gm^r foi verificada por extração de plasmídeos das estirpes mutantes.

3.5. Estabilidade das estirpes de *A. hydrophila* mutantes com sistema *quorum sensing* comprometido

A avaliação da estabilidade dos mutantes de *A. hydrophila* foi feita por transferências diárias das células para caldo Luria sem antibiótico por 15 dias. Após esse período, a cultura foi transferida para caldo Luria suplementado com 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina, para verificar a manutenção da resistência à gentamicina (BI, LIU e LU, 2007). Além disso, também foi realizado ensaio de indução por estrias cruzadas, com a estirpe monitora *C. violaceum* CV026, para verificar a produção de AHL pelos mutantes (STEIDLE et al., 2001).

3.6. Confirmação do gênero *Aeromonas* por rDNA16S, da interrupção do gene *ahyI* nas estirpes mutantes e avaliação da transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR*

Para verificar a identidade dos mutantes como sendo da espécie *A. hydrophila*, foi realizada amplificação de rDNA 16S utilizando os oligonucleotídeos e condições descritas no item 3.3, seguido do sequenciamento realizado na Macrogen (Coréia).

A amplificação dos genes *ahyI* e Gm^r foi feita utilizando oligonucleotídeos e condições descritas nos itens 3.3 e 3.4.1, para avaliar respectivamente, a integridade e presença desses genes. A proteína reguladora de resposta codificada pelo gene *ahyR*, também foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos *ahyR*-C/*PstI* e *ahyR*-N/*ScaI* (Tabela 3). Os genes *ahyRI*, juntamente com seus promotores foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos *ahyRI*-C/*ScaI* 5' e *ahyRI*-N/*EcoRI* (Tabela 3). A reação de PCR foi preparada utilizando GoTaq® Green Master Mix (Promega) conforme descrito pelo fabricante. A amplificação

foi realizada em aparelho modelo PTC-100 e os ciclos de amplificação foram realizados conforme descrito no item 3.4, com exceção do tempo de extensão que foi de 2 min. Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio e observado EagleyeTM (Stratagene®).

Para avaliar a transcrição dos genes *ahyI*, *ahyR* e *Gm^r* pelas estirpes selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 e pelo mutante QS *A. hydrophila* 029-14, o RNA total foi extraído utilizando TRI Reagente[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As estirpes selvagens foram cultivadas por 16 h e o mutante por 24 h, a 30 °C. Cerca de 1,5 mL das culturas, correspondendo a, aproximadamente, 10⁸ UFC, foram transferidos para tubo tipo *ependorf* e centrifugados a 6000 *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* adicionado 1 mL de Tri Reagent[®], misturado em vortex e deixado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio gelado, seguido de agitação vigorosa por 15 s e incubação a temperatura ambiente por 3 min, seguido por centrifugação a 12000 *g* por 15 min a 4 °C. Aproximadamente 400 µL da fase aquosa superior incolor contendo RNA foi transferida para um tubo tipo *ependorf*. Em seguida, foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado à fase aquosa e, após inversão dos tubos tipo *ependorf* para a mistura da amostra, esses foram incubados a temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 15000 *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o RNA foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 75 %, sob agitação vigorosa. As amostras foram centrifugadas a 7500 *g* por 5 min a 4 °C, o sobrenadante descartado cuidadosamente e o RNA foi seco ao ar. Posteriormente, o RNA foi ressuspensionado em 40 µL de água DEPC e mantido a -80 °C. O RNA foi quantificado por leitura das absorvâncias a 280 e 260 nm (A280/A260) em espectrofotômetro e a pureza e integridade do RNA foram avaliadas em gel de agarose 1 % e pela amplificação do rDNA 16S, conforme descrito no item 3.3. A síntese do cDNA foi realizada utilizando kit *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega, Madison, EUA) conforme descrito pelo fabricante. A amplificação dos genes *ahyI* e *ahyR*, utilizando como molde o cDNA obtido foi realizado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores e condições descritas no item 3.3 e 3.6, respectivamente, com exceção da temperatura de anelamento, que foi de 55 °C.

3.7. Avaliação da produção de AHLs por *A. hydrophila* selvagem e mutantes

A extração de AHL dos sobrenadantes de *A. hydrophila* foi realizada conforme descrito por Shaw et al. (1997). As culturas com a concentração de 10^4 UFC mL⁻¹ foram inoculadas em 100 mL de caldo TYEP (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1 g L⁻¹ e KH₂PO₄ 1 g L⁻¹) e incubadas a 30 °C sob agitação de 180 rpm por 24 h ou 48 h, no caso dos mutantes. Então, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 *g* por 10 min e, a 100 mL do sobrenadante livre de células, foram adicionados 100 mL de acetato de etila acidificado com 0,5 % de ácido fórmico em um funil de separação de 500 mL. A mistura foi agitada por 3 min com liberação de gases a cada 20 s. Quando as duas fases estavam separadas, a fase com acetato de etila foi coletada. A extração foi repetida mais uma vez na fase aquosa, conforme descrito acima. Em seguida, a fase com acetato de etila foi coletada e misturada com a primeira. Essas etapas foram repetidas até finalizar os 100 mL de sobrenadante. Posteriormente, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo (modelo Q344B, Quimis, Brasil), ressuspensionado em 1 mL de acetato de etila e mantido a - 20°C.

A presença de AHLs foi verificada por cromatografia em camada delgada (TLC) (Cromatografia de camada fina C₁₈ fase reversa, sílica gel impregnada de hidrocarbonetos, 20 x 20 cm, *Analtech uniplat*TM). A TLC foi biorrevelada com a estirpe monitora *C. violaceum* CV026.

3.8. Avaliação de atividade proteolítica

A atividade de gelatinase foi avaliada em meio nutriente contendo como substrato 12 % de gelatina. As estirpes selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 e mutantes QS 029-8, 029-14 e 029-21, foram ativadas em caldo Luria 30 °C, por aproximadamente, 16 h. Posteriormente, 30 µL das culturas ativas foram inoculadas em 3 mL do meio gelatina acrescido ou não de 20 µM de butanoil-homoserina lactona (C4-AHL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) ou

acrescido de 1 % de extrato de AHL da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029 preparado conforme descrito no item 3.7. Os tubos com meio gelatina foram incubados por 7 dias a 30 °C e a revelação foi feita incubando os tubos a 7 °C. A não solidificação do meio a temperatura de 7 °C indicou a hidrólise da gelatina.

A atividade proteolítica das estirpes selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 e mutantes QS 029-8, 029-14 e 029-21 foi avaliada em ágar PCA (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com 2 % de leite desnatado reconstituído acrescido ou não de 20 µM de C4-AHL. As estirpes foram ativadas em 5 mL de caldo Luria acrescido de 25 µg mL⁻¹ de gentamicina apenas para o cultivo dos mutantes, e incubadas a 30 °C por 24 h. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas em microcentrífuga a 10.600 *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em mesmo volume de solução salina 0,85 %, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e a densidade óptica das células foi padronizada em 0,1 em espectrofotômetro Spectronic 20D+ a 600 nm. Aliquotas de 20 µL das culturas padronizadas foram depositadas no centro de placas de Petri contendo os meios relacionados anteriormente. O efeito do extrato de AHL da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029 também foi avaliado adicionando 5 µL do extrato de AHL, preparado conforme descrito no item 3.7, ao centro da placa contendo ágar PCA suplementado com 2 % de leite desnatado, antes da adição dos 20 µL das culturas padronizadas. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 h. Durante o período de incubação a atividade proteolítica foi avaliada pela presença de halo de clarificação.

A quantificação da atividade proteolítica foi realizada conforme descrito por Christensen et al. (2003). As culturas de *A. hydrophila* Embrapa 029, ATCC 7966 e mutantes QS foram cultivadas a 30 °C em meio TYEP, acrescido de 0,25 % de cloreto de cálcio. Aliquotas das culturas foram coletadas após 42 h de incubação, centrifugadas a 10.600 *g* por 10 min e os sobrenadantes esterilizados por filtração. Volumes de 150 µL dessas amostras foram adicionados a 250 µL de 2% de azocaseína (p/v), seguindo de incubação por 16 h a 30 °C. A reação enzimática foi cessada pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v). A mistura foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e então, centrifugada por 10 min a 10.600 *g*. Posteriormente, uma alíquota de 600 µL do sobrenadante foi adicionada a 750 µL de solução de NaOH 1 M. A atividade proteolítica foi

quantificada pela determinação do valor da absorvância a 450 nm em leitora de Microplacas Thermoplate Reader (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Os valores de absorvância 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.

A atividade proteolítica também foi avaliada pela coagulação do leite desnatado reconstituído (LDR) 12 % e do leite pasteurizado. O LDR 12 % foi inoculado com 1% das culturas selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 e mutantes QS ativas e com densidade óptica padronizada em 0,1. Os tubos foram incubados a 30 °C por 72 h. Durante o período de incubação, foi feita a observação visual da coagulação do leite, conforme realizado por Christensen et al. (2003).

A atividade proteolítica das estirpes de *A. hydrophila* Embrapa 029 selvagem, *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. hydrophila* mutante QS 029-14 também foram analisadas em zimograma contendo azocaseína como substrato (CHRISTENSEN et al., 2003). Como controle positivo foi utilizado o sobrenadante livre de células da estirpe *P. fluorescens* 041. As estirpes selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029, ATCC 7966 e mutante QS foram ativadas em 5 mL de caldo Luria ou caldo Luria acrescido 25 µg mL⁻¹ de gentamicina para o cultivo do mutante e incubadas a 30 °C por 24 h. Posteriormente, as culturas ativas foram centrifugadas a 10.600 *g* por 5 min, lavadas com solução salina 0,85 % e a densidade óptica das células foi padronizada em 0,1 em espectrofotômetro Spectronic 20D+ a 600 nm. Em seguida, 1 mL das culturas padronizadas foi inoculado em caldo TYEP adicionado de 0,25 % CaCl₂. Após incubação por 40 h a 30 °C e 180 rpm o sobrenadante livre de células das estirpes foi filtrado e concentrado por liofilização. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), para posterior aplicação no zimograma. Alíquotas dos extratos livres de células concentrados e quantificados foram adicionados de um volume correspondente 1/3 de tampão de amostra e submetidas à fervura por 10 min. Posteriormente, foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) acrescido de 0,2 % de azocaseína (CHRISTENSEN et al., 2003). Após eletroforese %. O gel foi submetido à eletroforese a 60 V no gel de concentração e 80 V no gel de separação, por aproximadamente, 2 h e 30 min, as proteínas foram

renaturadas conforme descrito por Christensen et al. (2003), incubando-se o gel em solução de Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) acrescido de isopropanol 25% (v/v) por 15 min. O gel foi incubado em Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) por 15 min. Este procedimento foi repetido por duas vezes, sendo que, na última etapa, a incubação com Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) foi por 12 h a 4 °C. A seguir, o gel foi submetido a etapa de renaturação, incubado por 24 h em Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 7,5) contendo 0,25 % de CaCl₂ 1 M a 30 °C. Para a revelação, foi adicionado ao gel uma solução de NaOH 1 M. A atividade proteolítica no gel foi evidenciada como zonas claras (CHRISTENSEN et al., 2003).

3.9. Avaliação das atividades amilolítica, hemolítica e lipolítica

Alíquotas de 20 µL das estirpes selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 e mutantes QS 029-8, 029-14 e 029-21, ativas e com densidade óptica padronizada em 0,1, foram inoculadas em meios sólidos contendo os substratos para enzimas avaliadas. A presença da enzima amilase foi avaliada em ágar nutriente (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) acrescido de 0,2 % de amido (STAMFORD et al., 1998), a atividade de hemolisinas em ágar base Columbia (Oxoid, Cambridge, UK) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (MURANO e HEIDNALL, 2001) e a atividade lipolítica foi avaliada em ágar Tween 80 (HABA et al., 2000). O efeito do extrato de AHL da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029 foi avaliado, adicionando-se 5 µL do extrato de AHL, preparado conforme descrito no item 3.7, ao centro das placas antes da adição dos 20 µL das culturas padronizadas. As placas foram incubadas a 30 °C por até 48 h.

3.10. Avaliação da motilidade

Para avaliar a motilidade *swimming*, foi utilizado ágar Luria acrescido de 0,3 % de ágar-ágar (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (KHAJANCHI et al., 2009). As estirpes selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 e mutantes QS 029-

8, 029-14 e 029-21 foram ativadas em caldo Luria ou caldo Luria acrescido de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina para o cultivo dos mutantes. O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.8. Uma alçada de cada cultura padronizada foi depositada no centro de placas de Petri contendo ágar Luria acrescido de 0,3 % de ágar suplementado ou não com 20 μM de C4-AHL. O efeito do extrato de AHL da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029 também foi avaliado adicionando 5 μL do extrato de AHL ao centro da placa contendo ágar Luria 0,3 %, antes da inoculação com uma alçada das culturas padronizadas. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 h e, durante o período de incubação, a motilidade foi avaliada.

3.11. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável

A formação de biofilmes pelas estirpes selvagens e pela estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14 foi realizada em cupons de aço inoxidável AISI 304, acabamento # 4, nas dimensões de 2,0 x 6,0 x 0,1 cm mantidos em meio TYEP por até 48 h de incubação a 30 °C conforme descrito por Joseph et al. (2001). Durante o período de incubação, os cupons foram retirados para a observação da formação de biofilmes pela coloração com laranja de acridina (PARIZZI, 1999), seguido de observação em microscópio de epifluorescência modelo PX60 (Olympus, Japão) e pela coloração com iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e diacetato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) seguido da observação em microscópio óptico de varredura a laser Confocal - modelo LSM 510 META (Zeiss, EUA). Cupons também foram retirados para a quantificação de células aderidas após ação de ultrassom (Ultrasonic Cleaners – Model 1510), durante 30 min, para a remoção das células e a determinação do número de células pela técnica de microgotas (MORTON, 2001).

3.12. Eletroforese e sequenciamento de proteínas

As proteínas dos extratos extracelulares e intracelulares foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970), em Sistema *Mini-Protean[®] Tetra cell Electrophoresis System*. Alíquotas do extrato protéico livre de células das estirpes *A. hydrophila* Embrapa 029 selvagem, *A. hydrophila* ATCC 7966 e mutante Δ ahyI de *A. hydrophila* 029-14, cultivadas em caldo TYEP adicionado de cloreto de cálcio e incubados a 30 °C/180 rpm por 40 h, foram liofilizadas e ressuspensas em 50 mM de Tris-HCL pH 8,0, de forma a obter o sobrenadante concentrado cerca de 30 vezes. Para a obtenção do extrato de proteínas intracelulares, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas em salina 0,85 %, ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) acrescido de PMSF 1 mM e EDTA 5 mM, e rompidas em sonificador, com seis ciclos de 1 min com intervalos de 1 min em banho de gelo. O extrato proteico intracelular foi centrifugado a 9000 *g* por 15 min e o sobrenadante coletado. As proteínas das amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e o volume contendo 10 µg de proteína foi adicionado ao tampão da amostra e submetido à fervura por 10 min. Posteriormente, um volume máximo de 30 µL foi aplicado em gel de poliacrilamida 12 %. O gel foi submetido à eletroforese a 60 V no gel de concentração e 80 V no gel de separação, por aproximadamente 2 h e 30 min. Em seguida, o gel foi fixado e corado com o corante azul de Coomassie coloidal G-250 (GÖRG, 2004).

Para a identificação de proteína extracelular diferencialmente expressa, a banda correspondente à proteína foi excisada do gel. Posteriormente este fragmento foi descorado, lavado para a remoção do Comassie e SDS residuais, as proteínas foram reduzidas e alquiladas, seguindo-se de digestão com tripsina e extração dos peptídeos do gel (SHEVCHENKO et al., 2006; LOUREIRO et al., 2010). Os peptídeos incorporados à matriz α -ciano para a análise por espectrometria de massa em equipamento Ultraflex Maldi TOF/TOF (Bruker) do Núcleo de Análise de Biomoléculas - UFV. Também foi feito o sequenciamento da região amino-terminal da proteína pelo método de Edman utilizando sequenciador PPQS 33A (Shimadzu) do Núcleo de Análise de Biomoléculas - UFV. A banda correspondente à proteína diferencialmente expressa foi transferida

para membrana de PVDF, por Western blot (TOWBIN et al., 1979) e a proteína contida na membrana foi analisada. As sequências correspondentes aos espectros ou a sequência amino-terminal foram analisadas no banco de dados NCBI pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

4. Resultados e Discussão

4.1. Suscetibilidade de *A. hydrophila* a antibióticos

A estirpe *A. hydrophila* Embrapa 029 foi incapaz de crescer em meio Luria contendo até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina após 48 h de incubação a 30 °C. Entretanto, cresceu na presença de 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e ampicilina. Este perfil de sensibilidade à gentamicina e resistência a estreptomicina e ampicilina coincidem com os apresentados no Manual de Bergey (MURRAY et al., 1983), para a espécie *A. hydrophila*.

4.2. Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de rDNA 16S e *ahyI* de *A. hydrophila*

Utilizando o DNA total de *A. hydrophila* Embrapa 029, ATCC 7966 e oligonucleotídeos específicos, o gene rDNA 16S foi amplificado por PCR e o produto da reação foi submetido à análise eletroforética. Em ambas as estirpes foi observado um produto de cerca de 650 pb (Figura 4). A análise de sequenciamento seguido por comparação das sequências no programa BLAST mostraram que *A. hydrophila* Embrapa 029 apresenta 99 % de identidade com a estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966.

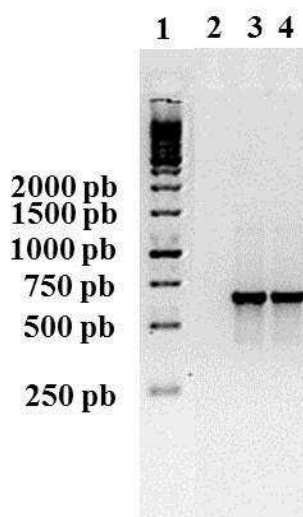


Figura 4 – Confirmação da amplificação do gene rDNA16S de *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, Marcador DNA *ladder* 1kb Gene Ruler™ (Fermentas); Canaleta 2, Branco; Canaleta 3, rDNA 16S de *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta 4, rDNA 16S de *A. hydrophila* ATCC 7966.

O sequenciamento de *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 indicou a amplificação de 577 nucleotídeos que corresponde a região codificadora do gene (Figura 5). A comparação da sequência do gene *ahyI* obtida, no programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), com outras sequências *ahyI* contidas no banco de dados revelou que este gene de *A. hydrophila* Embrapa 029 apresenta 99 % de identidade com o da estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. hydrophila* AN-1 e 95 % de identidade com a estirpe *A. hydrophila* SSU. Segundo Seshadri et al. (2006), *A. hydrophila* ATCC 7966 possui o gene *ahyI*, com 624 pares de bases, 63 % de conteúdo GC e 37 % de conteúdo AT. Mesmo contendo os genes *ahyR* e *ahyI* do sistema *quorum sensing*, *A. hydrophila* ATCC 7966 não foi capaz de induzir resposta mediada por AHL em *C. violaceum* CV026. Esta estirpe ATCC também não induz *E. coli* JM109 pSB403 e *E. coli* JM109 pJBA82, bioindicadores da presença de AHLs e, segundo Jangid et al. (2007), foi verificada uma inserção CAT, na posição 402 do gene *ahyR* de *A. hydrophila* ATCC 7966 o que poderia levar a uma proteína não funcional. Além da estirpe ATCC 7966, outras 72 estirpes de *A. hydrophila* apresentaram os homólogos *luxRI* com identidade de sequência muito elevada (JANGID et al., 2007), sugerindo que este gene é muito conservado nas diferentes estirpes de *A. hydrophila*.

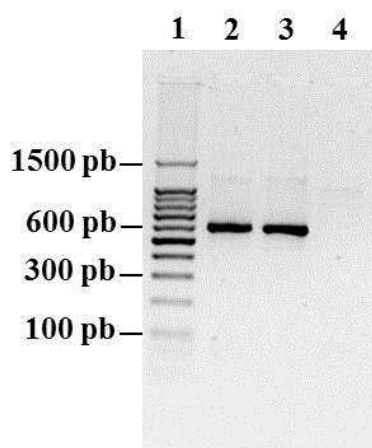


Figura 5- Confirmação da amplificação do gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, Marcador DNA *ladder* 100 pb (Promega); Canaleta 2, *ahyI* de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 3, *ahyI* de *A. hydrophila* EMBRAPA 029; Canaleta 4, Branco.

4.3.Construção de *A. hydrophila* mutante incapaz de produzir AHL

4.3.1. Construção de mutante *A. hydrophila* Δ *ahyI* utilizando o vetor suicida pKNG101

Com o objetivo de obter estirpes de *A. hydrophila* Embrapa 029 mutantes incapazes de sintetizar AHL, pela interrupção do gene *ahyI* com o gene Gm^r , utilizando o vetor suicida pKNG101, foi necessário adotar estratégias com o uso de várias construções. A primeira construção foi gerada pela ligação do gene *ahyI* purificado e clivado com as enzimas de restrição *SalI* e *XbaI* ao vetor pUC18, seguido da transformação da construção pUC18-*ahyI* em *E. coli* DH5 α . Após a extração plasmidial e análise eletroforética foi possível verificar que o gene *ahyI* estava ligado ao vetor pUC18 (Figura 6).

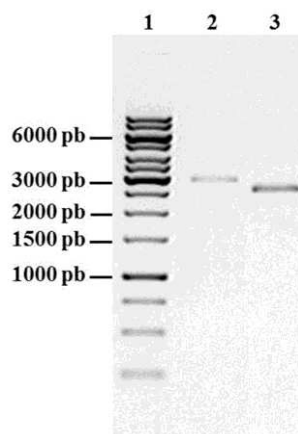


Figura 6 – Clonagem do gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 no vetor pUC18. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do vetor pUC18 contendo *ahyI* após extração plasmidial. Canaleta 1, Marcador DNA *ladder* 1 kb Gene Ruler™ (Fermentas); Canaleta 2, pUC18 contendo *ahyI*; Canaleta 3, pUC18.

A banda de aproximadamente 900 pb no gel de agarose corresponde ao gene Gm^r purificado e clivado com a enzima de restrição *ClaI* (Figura 7 A). Segundo Martins (2007) o gene Gm^r apresenta 872 pb. Após a extração plasmidial de transformantes que receberam a construção pUC18-*ahyI*:: Gm^r , e análise eletroforética, foi possível confirmar que o gene Gm^r realmente estava ligado ao vetor pUC18-*ahyI* (Figura 7 B). A construção pUC18-*ahyI*:: Gm^r possui cerca de 4135 pb, o que é verificado na figura 7 B.

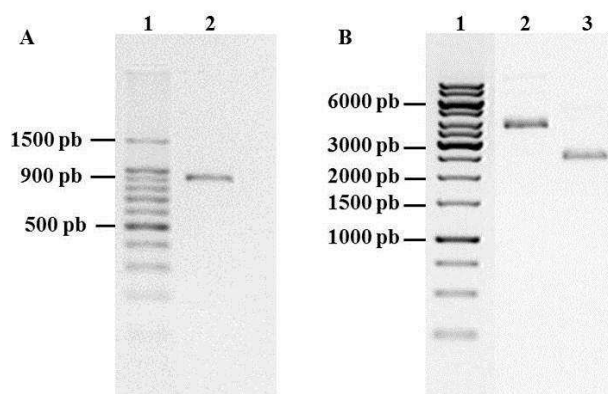


Figura 7 – Interrupção do gene *ahyI* com o gene que codifica a proteína gentamicina-3-acetil-transferase (Gm^r) na construção pUC18-*ahyI*. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,5 % do gene Gm^r purificado e clivado com *ClaI*. Canaleta 1, DNA *ladder* 100 pb (Promega); Canaleta 2, gene Gm^r purificado e clivado com *ClaI*. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da construção pUC18-*ahyI* contendo Gm^r . Canaleta 1, Marcador DNA *ladder* 1 kb Gene Ruler™ (Fermentas); Canaleta 2, pUC18-*ahyI*:: Gm^r ; Canaleta 3, pUC18.

O gene *ahyI*::Gm^r liberado do vetor pUC18 pela clivagem com as enzimas de restrição *SalI* e *XbaI* (Figura 8 A) e purificado foi ligado ao vetor pKNG101. O vetor pKNG101-*ahyI*::Gm^r foi transformado em *E. coli* SM10 λ pir e os transformantes selecionados. Após extração plasmidial e análise eletroforética, foi possível confirmar a inserção da construção *ahyI*::Gm^r no vetor pKNG101, pois o vetor apresentou tamanho de, aproximadamente, 8500 pb (Figura 8 B).

A presença da construção também foi confirmada pela análise eletroforética do produto de PCR, utilizando como molde o vetor pKNG101-*ahyI*::Gm^r os oligonucleotídeos *ahyI*-*XbaI* D e *ahyI*-*SalI* R. Na Figura 8 C é possível observar a amplificação de um fragmento de 1449 pb correspondente à construção *ahyI*::Gm^r.

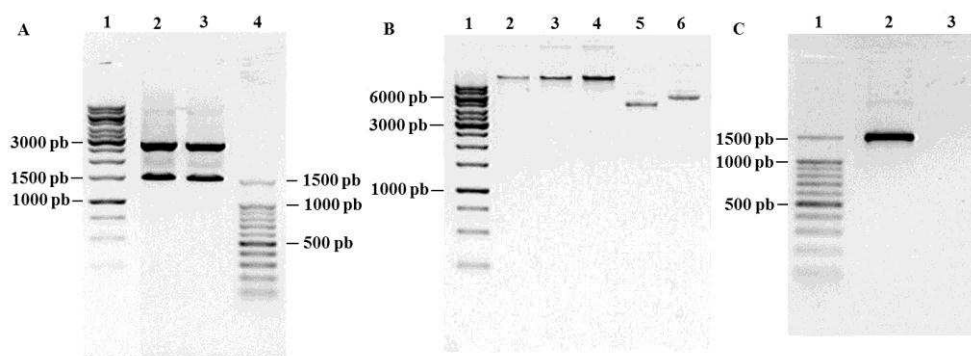


Figura 8 – Clonagem da construção *ahyI*::Gm^r no vetor pKNG101. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da construção pUC18-*ahyI*::Gm^r clivado com *SalI* e *XbaI*. Canaleta 1, DNA ladder 1kb Gene RulerTM (Fermentas); Canaleta 2, pUC18-*ahyI*::Gm^r clivado com *SalI* e *XbaI*; Canaleta 3, pUC18-*ahyI*::Gm^r clivado com *SalI* e *XbaI*; Canaleta 4, DNA ladder 100 pb (Promega). (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do vetor pKNG101-*ahyI*::Gm^r. Canaleta 1, Marcador DNA ladder 1 kb Gene RulerTM (Fermentas); Canaleta 2, DNA λ 25 ng; Canaleta 3, DNA λ 50 ng; Canaleta 4, DNA λ 100 ng; Canaleta 5, pKNG101; Canaleta 6, pKNG101-*ahyI*::Gm^r; (C) Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação da construção *ahyI*::Gm^r. Canaleta 1, DNA ladder 100 pb (Promega); Canaleta 2, *ahyI*::Gm^r; Canaleta 3, Branco.

O vetor pKNG101 contendo *ahyI::Gm^r* foi inserido na estirpe *A. hydrophila* 029 por dois procedimentos: transformação por eletroporação e transformação por choque térmico. Após o procedimento de eletroporação, foram selecionados 22 possíveis mutantes de *A. hydrophila* em ágar amido sais biliares verde brilhante acrescido de 25 µg mL⁻¹ de gentamicina. Todos os 22 possíveis mutantes foram capazes de hidrolisar o amido, 20 apresentaram colônias pequenas esverdeadas e dois apresentaram colônias grandes em ágar amido sais biliares verde brilhante após 48 h de incubação a 30 °C. Por procedimento de transformação por choque térmico, foi possível selecionar 32 possíveis mutantes de *A. hydrophila* em ágar Luria acrescido de 25 µg mL⁻¹ de gentamicina. Entretanto, apenas oito dos possíveis mutantes foram capazes de crescer em ágar amido sais biliares verde brilhante após 48 h de incubação a 30 °C. Os oito mutantes apresentaram colônias grandes e amareladas e foram capazes de hidrolisar o amido.

A confirmação da incapacidade de produzir AHLs pelos mutantes *ahyI* foi feita com a estirpe monitora *C. violaceum* CV026 e dos 22 mutantes obtidos por eletroporação, apenas oito (36,3 %) foram incapazes de induzir a estirpe monitora após 48 h a 30 °C (Tabela 4). Dos oito mutantes obtidos por transformação por choque térmico, sete (87,7 %) foram incapazes de induzir a estirpe *C. violaceum* CV026 após 48 h a 30 °C (Tabela 4).

Os oito possíveis mutantes incapazes de induzir a estirpe monitora *C. violaceum* CV026, obtidos por eletroporação, foram capazes de crescer em 5 % de sacarose, entretanto, apenas quatro foram capazes de crescer em 15 % de sacarose (Tabela 4). Os sete possíveis mutantes obtidos por transformação por choque térmico e incapazes de induzir a estirpe monitora *C. violaceum* CV026, foram capazes de crescer em 5 % e 15 % de sacarose após 48 h de incubação a 30 °C (Tabela 4). O crescimento em meio com sacarose indica que o gene *sacAB* não está presente no genoma dos possíveis mutantes, e com isso, é possível confirmar a ocorrência de dois eventos de recombinação, reforçando a evidência de que o vetor não está integrado e apenas o gene *Gm^r* permanece no genoma da estirpe de *A. hydrophila* mutante.

Tabela 4 – Confirmação de mutantes $\Delta ahyI$ de *A. hydrophila* por ensaio de indução por estrias cruzadas e crescimento em ágar Luria acrescido de 5% e 15% de sacarose de possíveis mutantes de *A. hydrophila*, com sistema *quorum sensing* comprometido, após 48 h de incubação a 30 °C.

Estirpes de <i>A. hydrophila</i>	Indução da estirpe <i>C. violaceum</i> CV026	Crescimento em sacarose	
		5 % de sacarose	15 % de sacarose
029 selvagem	+	*	*
029-1e	+	*	*
029-2e	-	+	-
029-3e	-	+	-
029-4e	+	*	*
029-5e	-	+	+
029-6e	+	*	*
029-7e	+	*	*
029-8e	-	+	+
029-9e	-	+	+
029-10e	+	*	*
029-11e	+	*	*
029-12e	+	*	*
029-13e	+	*	*
029-14e	+	*	*
029-15e	+	*	*
029-16e	+	*	*
029-17e	-	+	-
029-18e	+	*	*
029-19e	+	*	*
029-20e	+	*	*
029-21e	-	+	+
029-22e	+	*	*
029-1t	+	*	*
029-9t	-	+	+
029-10t	-	+	+
029-11t	-	+	+
029-13t	-	+	+
029-14t	-	+	+
029-15t	-	+	+
029-16t	-	+	+

* Característica não avaliada no isolado.

e – mutante obtido por eletroporação

t – mutante obtido por transformação por choque térmico

4.3.2. Construção de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ utilizando produto de PCR e sistema λ *red* recombinase

Utilizando o sistema λ *red* recombinase não foram obtidos mutantes $\Delta ahyI$ de *A. hydrophila*, pois não foi possível a seleção de *A. hydrophila* Embrapa 029 que tenha recebido os vetores pKD78 ou pKD119. Provavelmente, estes vetores não foram estáveis em *A. hydrophila*. O sistema λ *red* recombinase já foi utilizado para mutação sítio dirigida em estirpes de *E. coli* (DATSENKO e WANNER

2000), *Salmonella* (HUSSEINY e HENSEL, 2005), *Serratia* (ROSSI et al., 2006), *P. aeruginosa* (LESIC e RAHME, 2008), *Shigella* (RANALLO et al., 2006), *Yersinia* (DERBISE et al., 2003) e *Vibrio* (YAMAMOTO et al., 2009), mas não há relatos do uso deste sistema em estirpes de *A. hydrophila*.

4.3.3. Construção de *A. hydrophila* mutante Δ ahyRI, utilizando vetor suicida pSUP 202

Cerca de 50 possíveis mutantes Δ ahyRI foram obtidos por eletroporação e três possíveis mutantes Δ ahyRI foram obtidos por conjugação. Dos 53 mutantes obtidos por eletroporação e conjugação, 14 foram selecionados aleatoriamente para avaliação da mutação. Dos 14 possíveis mutante selecionados, quatro apresentaram a construção Δ ahyRI::Gm^r (Figura 9), evidenciada por uma banda de aproximadamente, 1500 pb e todos eles foram identificados como *A. hydrophila*, pois foi verificada a amplificação de rDNA 16S utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a espécie *A. hydrophila* (Figura 10).

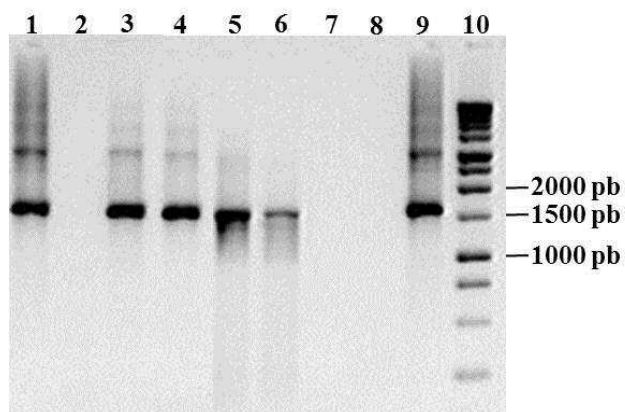


Figura 9 – Confirmação da amplificação dos genes Δ ahyRI::Gm^r nos mutantes Δ ahyRI de *A. hydrophila* por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, pSUP202 Δ ahyRI::Gm^r; Canaleta 2, vazia; Canaleta 3, Δ ahyRI::Gm^r de *A. hydrophila* mutante 029-11; Canaleta 4, Δ ahyRI::Gm^r de *A. hydrophila* mutante 029-24; Canaleta 5, Δ ahyRI::Gm^r de *A. hydrophila* mutante 029-2; Canaleta 6, Δ ahyRI::Gm^r de *A. hydrophila* mutante 029-3 ; Canaleta 7, Branco; Canaleta 8, vazia; Canaleta 9, pSUP202 Δ ahyRI::Gm^r; Canaleta 10, Marcador DNA ladder 1 kb Gene RulerTM (Fermentas).

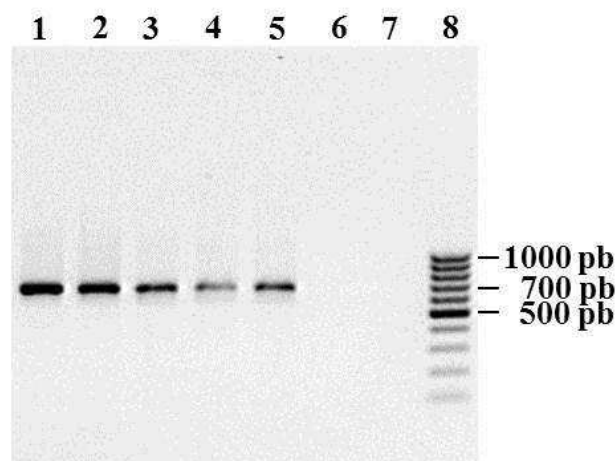


Figura 10 – Amplificação do gene rDNA 16S nos mutantes $\Delta ahyRI$ de *A. hydrophila* por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, rDNA 16S de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 2, gene *ahyR/I::Gm^r* de *A. hydrophila* mutante 029-11; Canaleta 3, gene *ahyR/I::Gm^r* de *A. hydrophila* mutante 029-24; Canaleta 4, gene *ahyR/I::Gm^r* de *A. hydrophila* mutante 029-2; Canaleta 5, gene *ahyR/I::Gm^r* de *A. hydrophila* mutante 029-3; Canaleta 6, Branco; Canaleta 7, vazia; Canaleta 8, Marcador DNA ladder 100 pb (Promega).

Os mutantes *A. hydrophila* 029-11 e 029-25 foram obtidos por eletroporação e os mutantes 029-2 e 029-3 foram obtidos por conjugação. Em ensaio de estrias cruzadas, os mutantes 029-11, 029-2 e 029-3, foram incapazes de induzir a produção de violaceína pela monitora *C. violaceum* CV026, indicando que não produzem AHLs. Entretanto, durante cinco dias de ensaio de estabilidade, as estirpes voltaram a produzir AHL e perderam a capacidade de crescer em gentamicina. A amplificação dos genes *ahyR* e *ahyI* das estirpes mutantes revelaram que os genes estavam intactos (Figura 11). Avaliação posterior mostrou que o vetor pSUP202 $\Delta ahyRI::Gm^r$, permaneceu replicando nas estirpes mutantes. Embora o vetor pSUP202 não tenha sido suicida em *A. hydrophila* Embrapa 029, este vetor foi usado em experimentos de mutação com *A. hydrophila* (MORAL et al., 1998) e em *A. salmonicida* subsp. *Achromogenes* (SCHWENTEIT et al., 2011), onde se comportou como suicida.

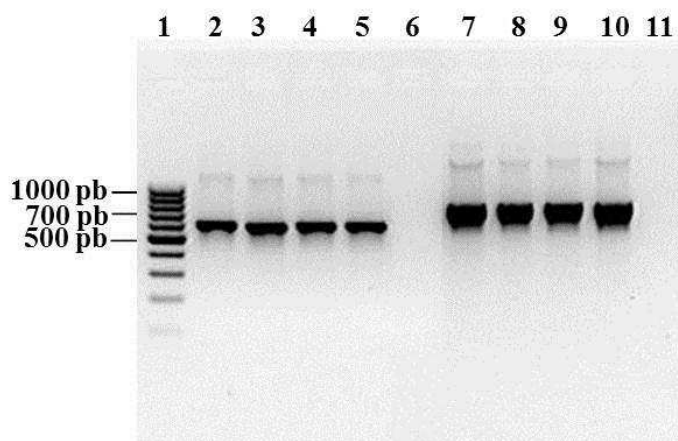


Figura 11 – Confirmação da amplificação dos genes *ahyI* e *ahyR* por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, Marcador DNA *ladder* 100 pb (Promega); Canaleta 2, *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta 3, gene *ahyI* de *A. hydrophila* mutante 029-11; Canaleta 4, gene *ahyI* de *A. hydrophila* mutante 029-2; Canaleta 5, gene *ahyI* de *A. hydrophila* mutante 029-3; Canaleta 6, Branco; Canaleta 7, *ahyR* de *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta 8, gene *ahyR* de *A. hydrophila* mutante 029-11; Canaleta 9, gene *ahyR* de *A. hydrophila* mutante 029-2; Canaleta 10, gene *ahyR* de *A. hydrophila* mutante 029-3; Canaleta 11, Branco.

4.4. Estabilidade das estirpes de *A. hydrophila* mutantes com sistema *quorum sensing* comprometido

Após a realização do teste de estabilidade, que consistiu em cultivar os mutantes por 15 dias, com repiques sucessivos em caldo Luria sem a adição de antibiótico, apenas as estirpes *A. hydrophila* mutantes $\Delta ahyI$ 029-8, 029-14 e 029-21 foram capazes de crescer em caldo Luria acrescido de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicina. Estes mesmos mutantes mantiveram também a capacidade de não induzir a estirpe monitora *C. violaceum* CV026 após 48 h de incubação a 30 °C.

4.5. Confirmação do gênero *Aeromonas* por rDNA16S e da interrupção do gene *ahyI* nas estirpes mutantes e avaliação da transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR*

O DNA total de *A. hydrophila* mutantes $\Delta ahyI$ 029-8, 029-14 e 029-21 foi extraído para a confirmação da espécie por sequenciamento do gene que codifica o rDNA 16S e da amplificação do gene *ahyI* interrompido por reação de PCR. A amplificação do rDNA 16S utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para *A. hydrophila* nestas estirpes (Figura 12), confirmam a identidade dos mesmos como *A. hydrophila*.

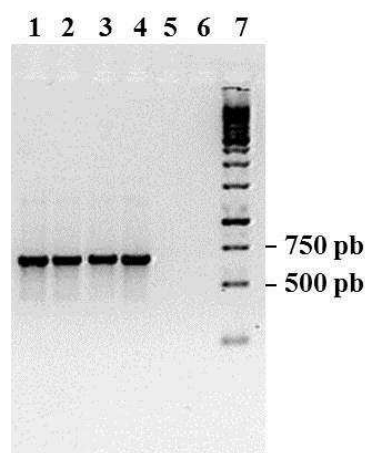


Figura 12 – Amplificação do gene rDNA 16S *A. hydrophila* selvagem Embrapa 029 e mutantes $\Delta ahyI$ por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, rDNA 16S de *A. hydrophila* 029; Canaleta 2, rDNA 16S de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-8; Canaleta 3, rDNA 16S de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-14; Canaleta 4, rDNA 16S de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-21; Canaleta 5, Branco rDNA 16S; Canaleta 7, Marcador DNA ladder 1 kb Gene RulerTM (Fermentas).

A análise de sequenciamento seguido por comparação das sequências no programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) mostrou que os mutantes *A. hydrophila* 029-8, 029-14 e 029-21 apresentam 99 % de identidade com a estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966. Entretanto, a interrupção de *ahyI* com o gene que confere resistência a gentamicina (Gm^r) não foi confirmada nos três mutantes. Por análise eletroforética do produto de PCR, utilizando como molde o DNA total dos

mutantes e os oligonucleotídeos *ahyI-XbaI* D e *ahyI-SalI* R, não foi possível observar o fragmento de 1449 pb correspondente à interrupção do gene *ahyI* com o gene Gm^r (*ahyI::Gm^r*) (Figura 13). Foi observado apenas o fragmento de 577 pb correspondente ao gene *ahyI* intacto (Figura 13). Em nenhum dos mutantes foi observado o fragmento de 872 pb correspondente ao gene Gm^r (Figura 13) quando utilizado como oligonucleotídeos iniciadores *gem-ClaI* D e *gem-ClaI* R e as condições da reação de PCR descritas no item 3.4.1.

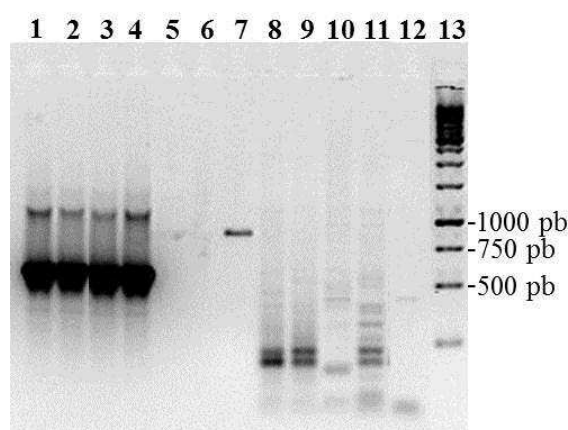


Figura 13 – Amplificação dos genes *ahyI* e Gm^r de *A. hydrophila* Embrapa 029 e de mutantes $\Delta ahyI$ por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, gene *ahyI* de *A. hydrophila* 029; Canaleta 2, gene *ahyI* de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-8; Canaleta 3, gene *ahyI* *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-14; Canaleta 4, gene *ahyI* *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-21; Canaleta 5, Branco *ahyI*; Canaleta 6, vazia; Canaleta 7, gene Gm^r purificado; Canaleta 8, controle negativo de Gm^r de *A. hydrophila* 029; Canaleta 9, gene Gm^r de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-8; Canaleta 10, gene Gm^r de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-14; Canaleta 11, gene Gm^r de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-21; Canaleta 12, Branco Gm^r ; Canaleta 13, Marcador DNA ladder 1 kb Gene Ruler™ (Fermentas).

Quando as condições da PCR foram alteradas para a amplificação do gene Gm^r , com diminuição da temperatura de anelamento para 55 °C e aumento do tempo de extensão para 2 min, foi possível observar a presença do fragmento de 872 pb correspondente ao gene Gm^r no genoma do mutante $\Delta ahyI$ de *A. hydrophila* 029-14 (Figura 14).

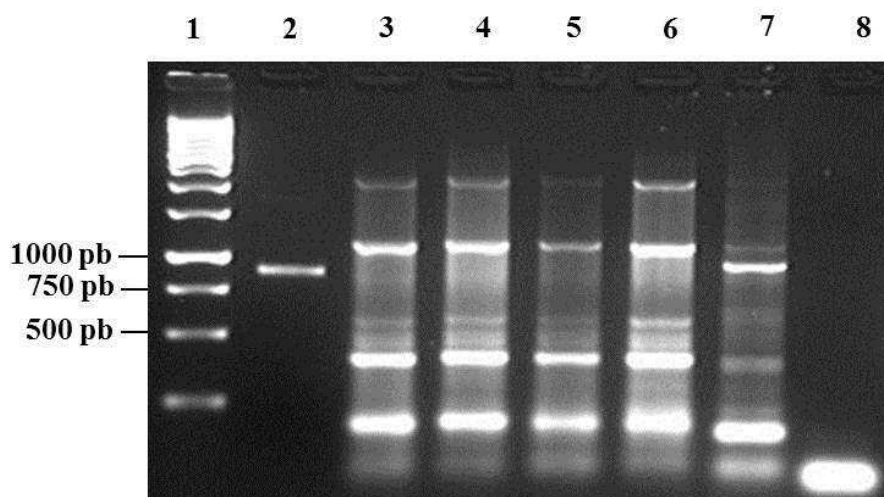


Figura 14 – Confirmação da amplificação do gene Gm^r em *A. hydrophila* mutantes $\Delta ahyI$ por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, Marcador DNA ladder 1 kb Gene Ruler™ (Fermentas); Canaleta 2, gene Gm^r purificado; Canaleta 3, controle negativo do gene Gm^r em *A. hydrophila* 029; Canaleta 4, controle negativo do gene Gm^r em *A. hydrophila* 16, Canaleta 5, gene Gm^r de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-8; Canaleta 6, gene Gm^r de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-21; Canaleta 7, gene Gm^r de *A. hydrophila* mutante $\Delta ahyI$ 029-14; Canaleta 8, Branco Gm^r .

O fragmento correspondente ao gene *ahyR*, de 783 pb, presente nos mutantes não variou de tamanho quando comparado à estirpe selvagem *A. hydrophila* 029 (Figura 15). A análise de sequenciamento do gene *ahyR* seguida de comparação das sequências no programa BLAST mostrou que o gene *ahyR* dos mutantes *A. hydrophila* 029-8, 029-14 e 029-21 apresentam 100, 99 e 100 % de identidade com o gene *ahyR* da estirpe *A. hydrophila* Embrapa 029, respectivamente. Também não foi possível verificar a inserção do gene Gm^r na região que compreende os genes *ahyR* e *ahyI*, juntamente com suas regiões promotoras. Foi observado nos mutantes, um fragmento correspondente aos genes *ahyRI*, de 1972 pb, conforme observado na estirpe *A. hydrophila* 029 selvagem (Figura 15). Não foi observada a presença do gene Gm^r na região promotora dos genes *ahyRI* das estirpes mutantes *A. hydrophila* 029-8, 029-14 e 029-21 por análise de sequenciamento do seguido por comparação das sequências no programa BLAST. Alteração na sequência de nucleotídeos que compreendem o box de ligação de AhyR não foi verificada quando comparada as sequências das estirpes mutantes e selvagem de *A. hydrophila*. Entretanto, foi possível observar a

inserção ou substituição de alguns nucleotídeos da região entre os genes *ahyRI* nos mutantes *A. hydrophila* 029-8 e 029-14. Provavelmente, estas alterações possam interferir na transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR*, mas não explicam a manutenção da resistência à gentamicina. Estes resultados indicam a integridade dos genes *ahyI*, *ahyR* e região entre os genes *ahyRI* o que não explica a perda da capacidade de produzir AHL, observada nestes mutantes. Esta incapacidade de produzir AHL no mutante 029-14 foi confirmada por RT PCR pois não foram detectados os respectivos transcritos, uma vez que não pode ser verificada a presença de bandas referentes a esses genes, após reação de PCR utilizando como molde cDNA da estirpe (Figura 16 e 17). Pelo fato dos genes permanecerem intactos, os mutantes serão chamados de mutantes com o sistema *quorum sensing* comprometido, ou seja, mutantes QS.

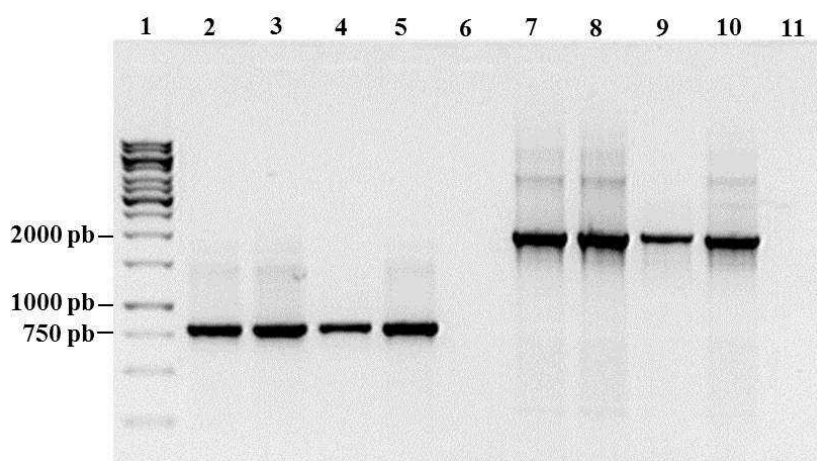


Figura 15 – Amplificação dos genes *ahyR* e *ahyRI* de *A. hydrophila* mutantes Δ *ahyI* por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, Marcador DNA ladder 1 kb Gene Ruler™ (Fermentas); Canaleta 2, gene *ahyR* de *A. hydrophila* 029; Canaleta 3, gene *ahyR* de *A. hydrophila* mutante 029-8; Canaleta 4, gene *ahyR* de *A. hydrophila* mutante 029-14; Canaleta 5, gene *ahyR* de *A. hydrophila* mutante 029-21; Canaleta 6, Branco *ahyR*; Canaleta 7, gene *ahyRI* de *A. hydrophila* 029; Canaleta 8, gene *ahyRI* de *A. hydrophila* mutante 029-8; Canaleta 9, gene *ahyRI* de *A. hydrophila* mutante 029-14; Canaleta 10, gene *ahyRI* de *A. hydrophila* mutante 029-21; Canaleta 11, Branco *ahyRI*.

Pela técnica de RT-PCR foi possível verificar a transcrição dos genes *ahyI* (Figuras 16) e *ahyR* (Figuras 17) na estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029.

Apesar da estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966 não produzir AHL e não responder a AHLs sintéticas, foi possível verificar que os genes *ahyI* e *ahyR* são transcritos, pois foram amplificados utilizando o cDNA molde (Figuras 16 e 17). É importante ressaltar a presença de duas bandas referentes à amplificação do gene *ahyI* de *A. hydrophila* ATCC 7966 (Figura 16), o que sugere a presença de duas sintases de AHL. Tal informação ainda não foi citada na literatura consultada.

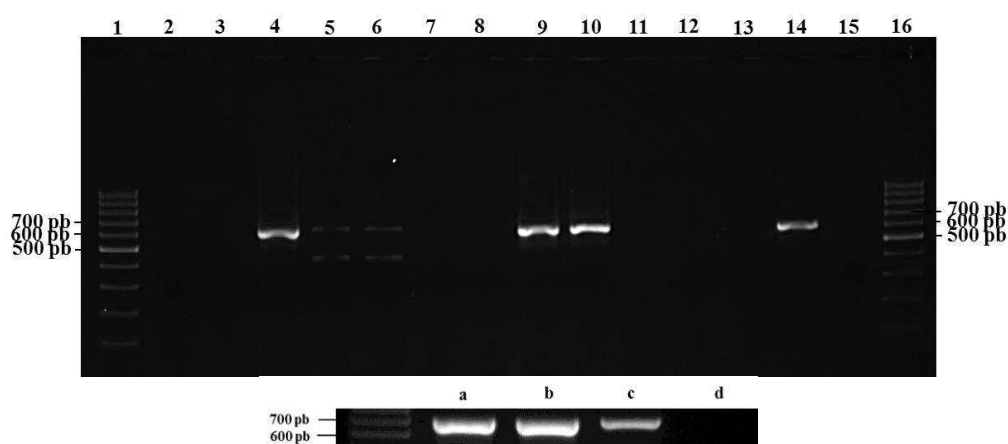


Figura 16 – Confirmação da amplificação do gene *ahyI* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* selvagens e mutante por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, Marcador DNA ladder 100 pb Gene Ruler™ (Fermentas); Canaleta 2, branco *ahyI*; Canaleta 3, branco cDNA *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 4, controle positivo de *ahyI* utilizando como molde DNA genômico de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 5, gene *ahyI* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 6, gene *ahyI* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 7, branco *ahyI*; Canaleta 8, branco cDNA *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta 9, controle positivo de *ahyI* utilizando como molde DNA genômico de *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta 10, gene *ahyI* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* 029; Canaleta 11, vazia; Canaleta 12, branco *ahyI*; Canaleta 13, branco cDNA *A. hydrophila* 029-14; Canaleta 14, controle positivo de *ahyI* utilizando como molde DNA genômico de *A. hydrophila* 029-14; Canaleta 15, gene *ahyI* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* 029-14; Canaleta 16, Marcador DNA ladder 100 pb Gene Ruler™ (Fermentas). Canaleta a, rDNA 16S utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta b, rDNA 16S utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta c, rDNA 16S utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* 029-14; Canaleta d, branco.

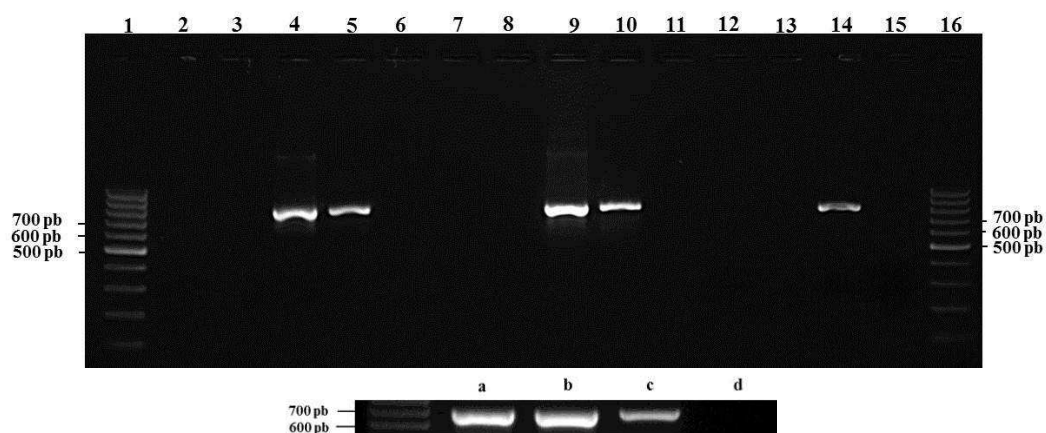


Figura 17 – Confirmação da amplificação do gene *ahyR* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* selvagens e mutante por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Canaleta 1, Marcador DNA ladder 100 pb Gene Ruler™ (Fermentas); Canaleta 2, branco *ahyR*; Canaleta 3, branco cDNA *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 4, controle positivo de *ahyR* utilizando como molde DNA genômico de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 5, gene *ahyR* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta 6, vazia; Canaleta 7, branco *ahyR*; Canaleta 8, branco cDNA *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta 9, controle positivo de *ahyR* utilizando como molde DNA genômico de *A. hydrophila* Embrapa 029, Canaleta 10, gene *ahyR* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* 029, Canaleta 11, vazia; Canaleta 12, branco *ahyR*; Canaleta 13, branco cDNA *A. hydrophila* 029-14; Canaleta 14, controle positivo de *ahyR* utilizando como molde DNA genômico de *A. hydrophila* 029-14; Canaleta 15, gene *ahyR* utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* 029-14; Canaleta 16, Marcador DNA ladder 100 pb Gene Ruler™ (Fermentas). Canaleta a, rDNA 16S utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* ATCC 7966; Canaleta b, rDNA 16S utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* Embrapa 029; Canaleta c, rDNA 16S utilizando como molde cDNA de *A. hydrophila* 029-14; Canaleta d, branco.

Não foi possível verificar a transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR* no mutante QS 029-14 (Figuras 16 e 17). Este resultado confirma que o sistema *quorum sensing* está inativo na estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14. A ausência de transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR* pode ser atribuída a alguma alteração na região promotora ou na região de ligação da RNA polimerase ao DNA, que impeça a transcrição destes genes, mesmo que a não seja observada nenhuma diferença no tamanho do amplicon correspondente a região promotora. Outra explicação para a inibição da transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR* na estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14, pode ser a necessidade de outros fatores de transcrição, o que indica que a

regulação do sistema *quorum sensing* em *A. hydrophila* pode ser mais complexa do que o descrito na literatura. Assim, de alguma maneira, durante o procedimento de mutação, pode ter ocorrido alguma alteração neste fator ou fatores de transcrição que impediram a transcrição de *ahyI* e *ahyR*. Em outras bactérias, a complexidade de regulação do sistema *quorum sensing* já foi evidenciada. Em *P. aeruginosa*, o *quorum sensing* é composto por dois circuitos chamados, LasIR e RhlIR. Além desses sistemas, *P. aeruginosa* também responde a 2 heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), que parece atuar como um elo entre os sistemas LasIR e RhlIR (JAYARAMAN e WOOD, 2008). Em *Agrobacterium tumefaciens*, a transcrição do gene *traR* que codifica o regulador transcricional, ocorre na presença de opinas específicas, denominadas de conjugais (WHITE e WINANS, 2007). São necessários estudos mais detalhados da regulação do sistema *quorum sensing* em *A. hydrophila* Embrapa 029 para elucidar e explicar os resultados encontrados.

4.6. Avaliação da produção de AHLs por *A. hydrophila* selvagem e mutantes

Quando analisada por cromatografia em camada fina, a presença de AHLs foi detectada apenas no extrato da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029, enquanto os extratos dos mutantes QS 029-8, 029-14 e 029-21 não induziram a produção de violaceína em *C. violaceum* CV026 (Figura 18). A concentração mínima de 1 μ M de C6-AHL é capaz de induzir a estirpe monitora *C. violaceum* CV026, conforme informado por Maria Emilene Martino Campos-Galvão¹. É possível sugerir que as AHLs presentes no extrato de *A. hydrophila* Embrapa 029 possuem de quatro a seis carbonos.

Segundo Swift et al. (1997), a principal molécula sinalizadora produzida por *AhyI* é a butanoil-homoserina lactona (C4-AHL), adicionalmente, uma segunda molécula, sintetizada em menor concentração foi identificada como hexanoil-homoserina lactona (C6-AHL). Resultado semelhante foi encontrado por

¹ Informação obtida por comunicação pessoal com Maria Emilene Martino Campos-Galvão, doutoranda em Microbiologia Agrícola – UFV, em Outubro de 2011.

Chan et al. (2011), que verificaram que C4-AHL e C6-AHL são as principais moléculas sinalizadoras produzidas por 22 isolados clínicos de espécies de *Aeromonas*. Além disso, esses autores verificaram em 10 isolados de *A. hydrophila*, a presença de uma suposta *N*-pentanoil-homoserina lactona (C5-AHL) e, em um dos isolados, não foi verificada a presença de C6-AHL (CHAN et al., 2011).

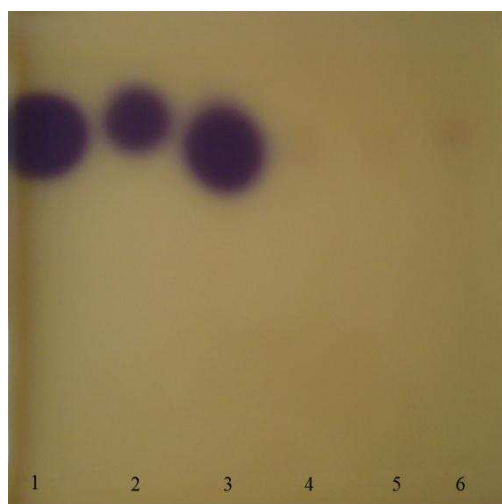


Figura 18 – Cromatografia em camada fina (TLC) de extratos de AHL de *A. hydrophila* selvagem e mutantes. Canaleta 1, Hexanoil homoserina lactona 0,1 mg mL⁻¹ (6 µL); Canaleta 2, butanoil-homoserina lactona 1 mg mL⁻¹ (6 µL); Canaleta 3, Extrato de AHL de *A. hydrophila* 029 (60 µL); Canaleta 4, Extrato de AHL de *A. hydrophila* mutante 029-8 (60 µL); Canaleta 5, Extrato de AHL de *A. hydrophila* mutante 029-21 (60 µL); Canaleta 6, Extrato de AHL de *A. hydrophila* mutante 029-14 (60 µL).

4.7. Atividade proteolítica

A atividade de gelatinase, determinada pela capacidade de liquefazer o meio contendo 12 % de gelatina como agente solidificante, foi constatada nas estirpes *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 cultivadas em meio gelatina acrescido ou não de 20 µM de C4-AHL. Destaca-se que a hidrólise da gelatina foi detectada após o período de incubação de 48 e 72 h pelas estirpes 029 e ATCC 7966 de *A. hydrophila*, respectivamente. A capacidade de *A. hydrophila* hidrolisar

a gelatina está registrada no Manual de Bergey (MURRAY et al., 1983). As estirpes de *A. hydrophila* mutantes QS 029-8, 029-14 e 029-21 não foram capazes de hidrolisar a gelatina, após 7 dias de incubação a 30 °C. Este fenótipo não foi revertido em cultivo na presença de C4-AHL sintética, o que pode ser explicado, pelo fato de não ter havido transcrição do gene *ahyR* e, consequentemente, a proteína AhyR nos mutantes.

A atividade proteolítica em ágar PCA suplementado com 2 % de leite em pó desnatado foi verificada apenas nas estirpes selvagens de *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966 após 24 h de incubação a 30 °C. Pode-se constatar que o halo de hidrólise da caseína do leite foi consideravelmente maior na estirpe Embrapa 029 que na estirpe ATCC 7966 (Figura 19 B e 19 A). Esta menor atividade proteolítica foi confirmada pela técnica quantitativa (Tabela 5) e pode estar associada à incapacidade da estirpe ATCC 7966 de produzir AHL. O halo de hidrólise da caseína não foi verificado ao redor da colônia de *A. hydrophila* mutante QS 029-14, mesmo após 72 h de incubação (Figura 19 D) e a quantificação da atividade proteolítica resultou em valores muito baixos (Tabela 4). Os mutantes QS de *A. hydrophila* 029-8 e 029-21 apresentaram halo de hidrólise da caseína do leite após 48 h de incubação (Figura 19 C e 19 E). A estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-8 apresentou, com 48 h de incubação, um pequeno halo de hidrólise da caseína circundando a colônia (Figura 19 C) e apresentou valores de atividade proteolítica específica semelhantes à estirpe selvagem (Tabela 5). A estirpe mutante *A. hydrophila* QS 028-21 que apresentou valores de atividade proteolítica específica alta quando comparada a estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029 (Tabela 5). A presença de atividade proteolítica nas estirpes *A. hydrophila* QS 029-8 e 029-21 e ausência de atividade proteolítica na estirpe *A. hydrophila* QS 029-14, mostram que estes mutantes se comportam de maneiras distintas e que provavelmente, a mutação no sistema *quorum sensing* ocorreu de forma diferente nas três estirpes, mesmo sendo utilizada a mesma estratégia experimental.

A adição de 20 µM C4-AHL não restaurou a atividade proteolítica das estirpes mutantes em placas contendo ágar PCA acrescido de 2 % de leite desnatado. A adição de extrato de AHL da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029 provocou resultado falso positivo, pela presença de hidrólise da

caseína ocasionada pelo extrato utilizado como controle negativo. A ausência de reversão está relacionada à incapacidade dos mutantes de sintetizar AhyR.

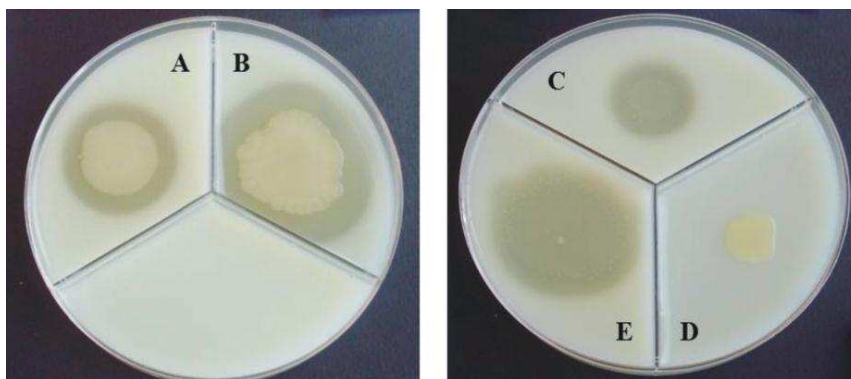


Figura 19 - Atividade proteolítica de culturas de *A. hydrophila* selvagens e mutantes QS em placas contendo ágar PCA suplementado com 2 % de leite em pó desnatado (LDR), incubadas a 30 °C por 72 h. (A) *A. hydrophila* ATCC 7966; (B) *A. hydrophila* Embrapa 029; (C) *A. hydrophila* 029-8; (D) *A. hydrophila* 029-14; (E) *A. hydrophila* 029-21.

Tabela 5 – Número de células e quantificação da atividade proteolítica de culturas de *A. hydrophila* selvagens e mutantes QS em meio TYEP acrescido de cloreto de cálcio incubadas a 30 °C por 42 h.

Estirpes	Nº células UFC mL ⁻¹	Atividade proteolítica (U h ⁻¹)	Atividade proteolítica específica
029	1,9 x 10 ⁹	2,9	2,9
ATCC 7966	8,0 x 10 ⁸	0,66	1,57
029-8 QS⁻	3,4 x 10 ⁸	0,45	2,51
029-14 QS⁻	5,6 x 10 ⁸	0,28	0,95
029-21 QS⁻	1,3 x 10 ⁹	2,6	3,8

As estirpes selvagens e *A. hydrophila* mutante QS 029-21 foram capazes de coagular o LDR 12 % após 24 h de incubação a 30 ° C (Figura 20). A coagulação pela estirpe selvagem *A. hydrophila* 029 foi tão intensa que restou apenas o soro do leite após 72 horas de incubação (Figura 20 A). Os mutantes QS 029-8 e 029-14 não foram capazes de coagular o LDR 12 % mesmo após 72 h de

incubação (Figura 20 C e 20 D). Este resultado confirma que os mutantes se comportam de maneira distinta, indicando que a mutação pode ter ocorrido de maneira diferente nos três mutantes.

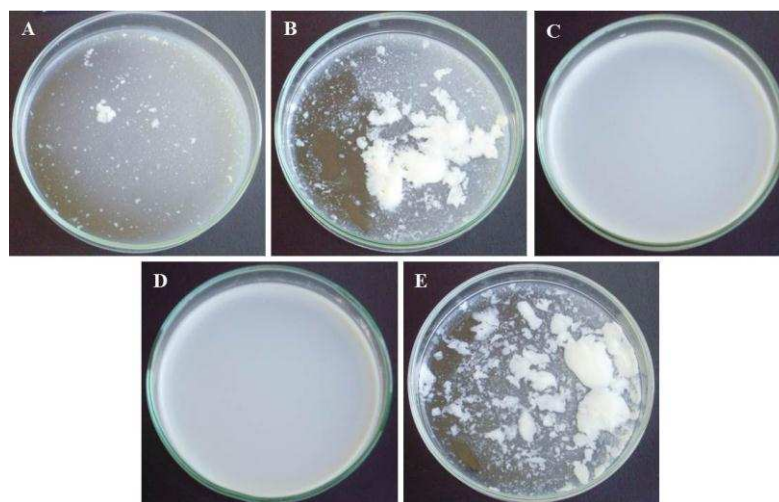


Figura 20 – Coagulação do leite desnatado reconstituído (LDR) 12% por de culturas de *A. hydrophila* incubadas a 30 °C por até 72 h. (A) *A. hydrophila* Embrapa 029 após 24 h de incubação; (B) *A. hydrophila* ATCC 7966 após 24 h de incubação; (C) *A. hydrophila* 029-8 QS⁻ após 72 h de incubação; (D) *A. hydrophila* 029-14 QS⁻ após 72 h de incubação; (E) *A. hydrophila* 029-21 QS⁻ após 24 h de incubação.

A ausência de atividade proteolítica nas estirpes de *A. hydrophila* mutantes QS 029-14 indica que este fenótipo pode ser regulado por *quorum sensing*, ou pelo mesmo fator ou por fatores que regulam a expressão dos genes *ahyI* e *ahyR*. Um fato importante observado é que a estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966, mesmo com o sistema *quorum sensing* comprometido, apresenta atividade proteolítica. Diversos autores relataram a perda da atividade proteolítica em mutantes de *A. hydrophila* com o sistema *quorum sensing* comprometido (SWIFT et al., 1999; BI, LIU e LU, 2007; KHAJANCHI et al., 2009). Em *A. hydrophila* AH-1N *ahyI* negativo, a adição de C4-AHL exógena, permitiu a restauração da atividade de exoproteases (metaloprotease e serinoprotease), observada em zimograma de caseína e gelatina e por quantificação da atividade proteolítica (SWIFT et al., 1999). A adição de 20 µM de C4-AHL exógena foi capaz de restaurar a atividade proteolítica de *A. hydrophila* SSU $\Delta ahyRI/ahyR^+$ (KHAJANCHI et al., 2009).

Atividade proteolítica também foi constatada na estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029, em zimograma contendo 0,2 % de azocaseína, caracterizada por uma banda clara (Figura 21). A protease de *P. fluorescens*, usada como controle positivo, possui massa molecular de, aproximadamente 50 kDa e assim, é possível inferir que a protease da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029, possui massa molecular menor, cerca de 30 kDa. Confirmando os resultados obtidos anteriormente, não foi possível verificar atividade proteolítica no sobrenadante livre de células da estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14 em zimograma (Figura 21).

Por zimograma não foi detectada a atividade proteolítica em *A. hydrophila* ATCC 7966, verificada anteriormente pelos métodos de hidrólise da gelatina e caseína do leite, da coagulação do leite e pela quantificação da atividade proteolítica em meio TYEP acrescido de 0,25% de CaCl_2 1 M (Figura 21). Possíveis explicações para a não detecção da atividade proteolítica no sobrenadante da cultura de *A. hydrophila* ATCC 7966 pelo zimograma seriam o fato da protease dessa estirpe estar ligada à membrana, ou por não ser renaturada corretamente na etapa executada com esta finalidade, indicado uma protease mais sensível do que a da *A. hydrophila* Embrapa 029. Outra possibilidade é a de que, por ter menor atividade proteolítica, a concentração do sobrenadante da cultura *A. hydrophila* ATCC 7966 usado na aplicação do gel não seja suficiente para a detecção de hidrólise em zimograma.

Lynch e colaboradores (1999) verificaram, em zimograma de caseína e gelatina, a presença de uma possível serinoprotease, de aproximadamente 60 kDa, no sobrenadante da estirpe selvagem *A. hydrophila* AH-1N que não foi detectada no sobrenadante da estirpe mutante *A. hydrophila* AH-1N *ahyI*-6. A incapacidade de produzir protease pelo mutante foi revertida na presença de 5 μM de C4-AHL. No sobrenadante filtrado de *A. hydrophila* SSU e do mutante *A. hydrophila* SSU ΔahyRI complementado com *ahyR*⁺ e *ahyI*⁺, foi verificado, em zimograma de caseína, a presença de três bandas com atividade proteolítica, correspondente a proteínas de 61, 52 e 19 kDa (KHAJANCHI et al., 2009). A protease de 61 kDa foi identificada como uma metaloprotease, mas a natureza das proteases de 52 e 19 kDa não foi determinada. No sobrenadante da estirpe mutante *A. hydrophila* SSU ΔahyRI , não foram verificadas as proteases de 61 e 52 kDa (KHAJANCHI et al., 2009).

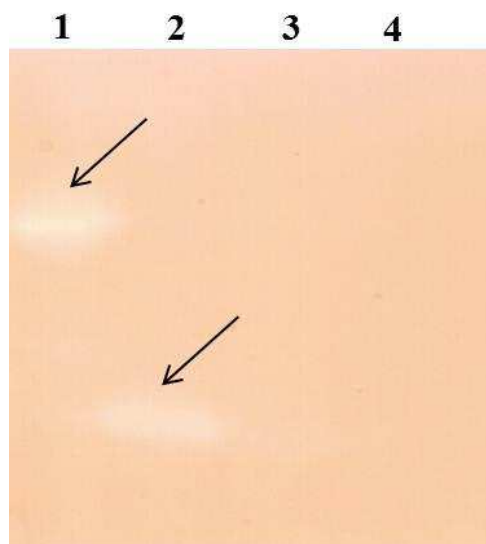


Figura 21 - Zimograma em SDS-PAGE 12 % utilizando como substrato 2 % de azocaseína. (1) Sobrenadante livre de células de *P. fluorescens* 041 (2) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* Embrapa 029 (10 µg de proteínas); (3) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* ATCC 7966 (10 µg de proteínas); (4) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* 029-14 QS⁻ (10 µg de proteínas).

4.8. Atividades amilolítica, hemolítica e lipolítica

As estirpes selvagens e mutantes foram capazes de hidrolisar o amido, após 24 h de incubação a 30 °C (Figura 22). A capacidade de *A. hydrophila* hidrolisar o amido está registrado no Manual de Bergey (MURRAY et al., 1983), e o resultado obtido sugere que o sistema *quorum sensing* não regula a expressão de genes relacionados com a atividade amilolítica. Resultados diferentes foram encontrados por Bi, Liu e Lu (2006) que verificaram que *A. hydrophila* mutante *ahyR* não produziu quantidades detectáveis de amilase.

A β-hemólise, verificada pela presença de halo claro ao redor das colônias, cultivadas em ágar sangue, foi verificada nas estirpes selvagens e mutantes *A. hydrophila* 029-8 QS e *A. hydrophila* 029-21 QS⁻, após 48 h de incubação a 25 °C. Na estirpe mutante *A. hydrophila* 029-14 QS⁻ não foi possível verificar a presença de β-hemólise. Este resultado reforça que os mutantes apresentam características distintas, indicando que a mutação pode ter ocorrido de maneira diferente. A

regulação da atividade de β -hemólise pelo *quorum sensing* havia sido considerada por Bi, Liu e Lu (2006) que verificaram que o mutante *ahyR* de *A. hydrophila* não produziu quantidades detectáveis de hemolisinas. A hemolisina é uma importante toxina secretada por *A. hydrophila* que contribui para a sua patogenicidade (SINGH et al., 2009). Análise da sequência do genoma de *A. hydrophila* ATCC 7966 revelou a presença de cinco genes que codificam hemolisinas, sendo três genes de hemolisinas, um gene de hemolisina termoestável e um gene de hemolisina III. Uma hemolisina de 68 kDa foi verificada em *A. hydrophila* AN14 (SINGH et al., 2009). Segundo Pandey, Naik e Dubey (2010) *A. hydrophila* AN4 possui atividade de β -hemólise ocasionada por uma hemolisina de 50 kDa.

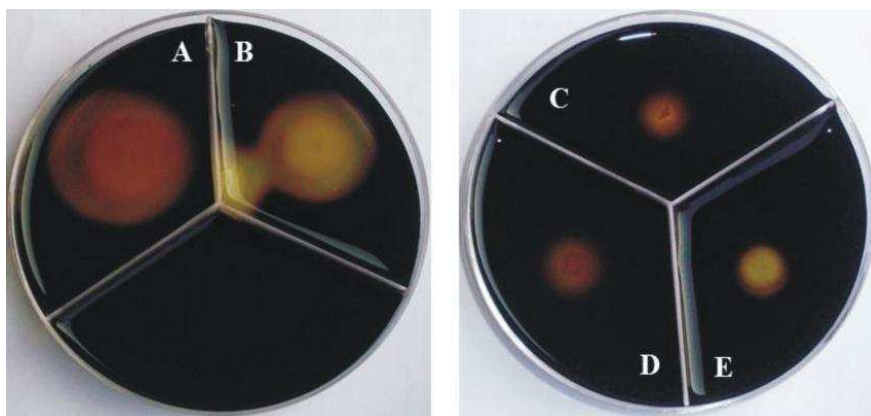


Figura 22 – Atividade amilolítica de culturas de *A. hydrophila* em placas contendo ágar amido, incubadas a 30 °C por até 48 h e reveladas com lugol. (A) *A. hydrophila* ATCC 7966; (B) *A. hydrophila* Embrapa 029; (C) *A. hydrophila* 029-8 QS⁻; (D) *A. hydrophila* 029-14 QS⁻; (E) *A. hydrophila* 029-21 QS⁻.

Atividade lipolítica em ágar Tween 80 foi verificada nas estirpes selvagens e mutantes QS após 48 h de incubação a 30 °C (Figura 23) e sugere que o sistema *quorum sensing* ou o fator ou os fatores que regulam a expressão dos genes *ahyI* e *ahyR*, não regulam genes relacionados à atividade lipolítica.

Análise da sequência do genoma de *A. hydrophila* ATCC 7966 depositada no banco de dados NCBI revelou a presença de seis genes que codificam lipases, sendo três genes de possíveis esterase/lipase, um gene de lipase, um gene de lipase transmembrana e um gene de lipase extracelular. A presença de atividade lipolítica em estirpes de *Aeromonas* é relatada (ANGUITA, APARICIO e

NAHARRO, 1993; CHUANG et al., 1997; NEELAMBARI et al., 2011). Neelambari et al. (2011) detectaram e purificaram uma lipase de 34 kDa produzida por *A. hydrophila* isolada de ambiente marinho. Não há, na literatura consultada, evidências de que esta atividade hidrolítica seja regulada pelo sistema *quorum sensing* em *A. hydrophila*.

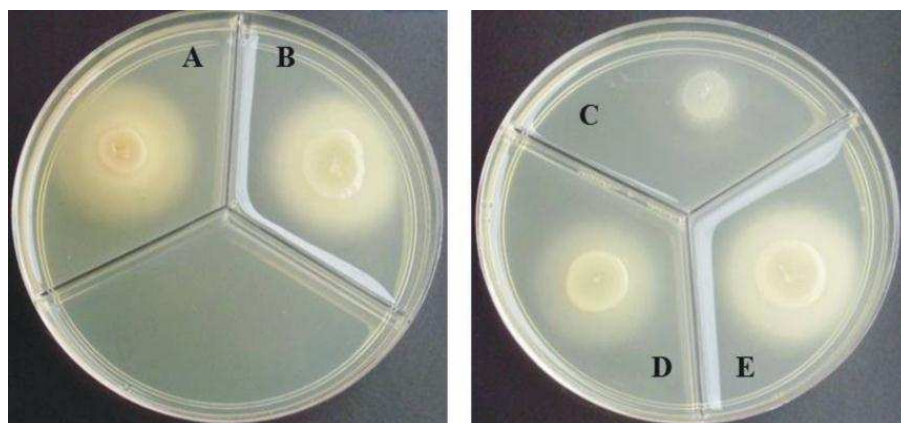


Figura 23 – Atividade lipolítica de culturas de *A. hydrophila* em placas contendo ágar Tween 80, incubadas a 30 °C por 72 h. (A) *A. hydrophila* ATCC 7966; (B) *A. hydrophila* Embrapa 029; (C) *A. hydrophila* 029-8 QS⁻; (D) *A. hydrophila* 029-14 QS⁻; (E) *A. hydrophila* 029-21 QS⁻.

4.9. Avaliação da motilidade

A motilidade tipo *swimming* foi verificada no selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029 em caldo Luria acrescido de 0,3 % de ágar, após 24 h de incubação a 30 °C (Figura 24 B). As estirpes mutantes QS 029-8 e 029-21 possuem a motilidade *swimming* (Figura 24 C e 24 E) enquanto *A. hydrophila* ATCC 7966 e o mutante QS 029-14 não apresentaram esta motilidade característica, mesmo após 72 h de incubação a 30 °C (Figura 24 A e 24 D). Estes resultados confirmam que os três mutantes possuem características diferentes. Em *A. hydrophila* ATCC 7966 foi demonstrada a presença de genes que codificam proteínas para o flagelo lateral, que não resulta neste tipo de motilidade (KHAJANCHI et al., 2009). A adição de 20 µM de C4-AHL e extrato de AHL da estirpe selvagem não induziu a motilidade *swimming* na estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966 e nem na estirpe *A.*

hydrophila mutante QS 029-14. A ausência de motilidade *swimming* na estirpe mutante *A. hydrophila* 029-14 QS⁻ indica que o sistema *quorum sensing* ou os fatores que regulam a expressão dos genes *ahyI* e *ahyR* podem estar envolvidos na regulação desta motilidade. Resultados diferentes foram apresentados por Khajanchi et al. (2009) que não observaram diferenças nas motilidades *swimming* e *swarming* do mutante *A. hydrophila* SSU Δ *ahyRI*. Kozlova e colaboradores (2008) verificaram motilidade *swimming* reduzida em *A. hydrophila* SSU *luxS*⁻, incapaz de sintetizar AI-2, quando comparado à estirpe selvagem e à estirpe mutante complementada com o gene *luxS*.

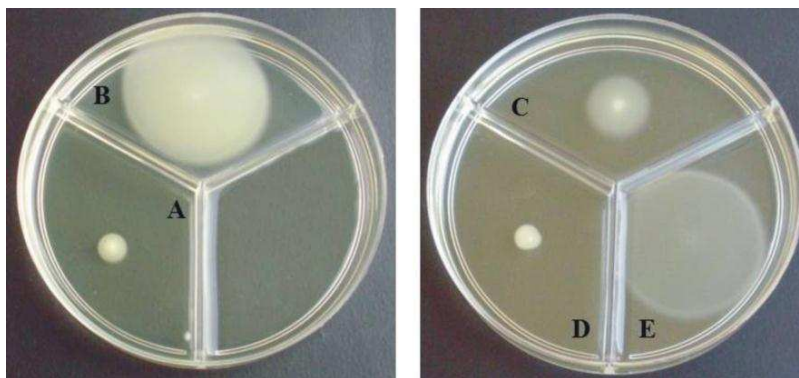


Figura 24 - Motilidade *swimming* em ágar Luria 0,3 % por estirpes de *A. hydrophila* selvagem e mutantes após 48 h de incubação a 30 °C. (A) *A. hydrophila* ATCC 7966; (B) *A. hydrophila* Embrapa 029; (C) *A. hydrophila* 029-8 QS⁻; (D) *A. hydrophila* 029-14 QS⁻; (E) *A. hydrophila* 029-21 QS⁻.

4.10. Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável

As estirpes de *A. hydrophila* selvagem Embrapa 029, ATCC 7966 e mutante QS de 029-14 foram capazes de aderir aos cupons de aço inoxidável a partir do tempo inicial de inoculação com inóculo padronizado (Figura 25). Com o aumento do tempo de incubação foi possível constatar a formação de biofilmes por *A. hydrophila* Embrapa 029 e ATCC 7966, enquanto a estirpe mutante QS 029-14 apresentou um baixo número de células aderidas (Figura 25). A capacidade de formação de biofilme em cupons de aço por *A. hydrophila*, após 24

h de cultivo em leite desnatado a 7 e 18 °C foi registrada na literatura por Boari et al. (2009).

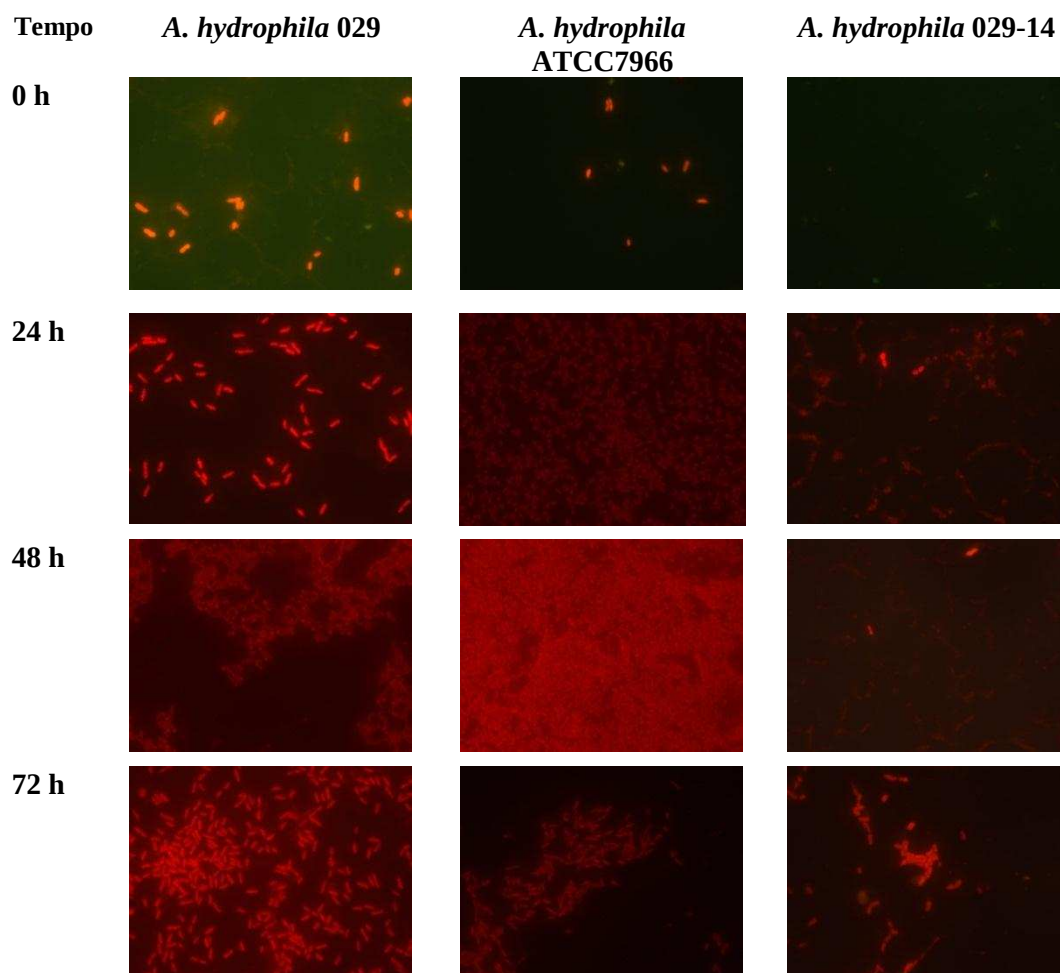


Figura 25 - Micrografias obtidas por microscopia de epifluorescência de biofilmes formados por *A. hydrophila* selvagem e mutante em cupons de aço inoxidável imersos em TYEP, a 30 °C, no período de 0 a 72 h de incubação, corados com laranja de acridina. Aumento de 1000 vezes.

A diferença na contagem do número de células viáveis nos biofilmes formados pelas estirpes selvagens e *A. hydrophila* mutante QS 029-14 aderidas nos cupons incubados em caldo TYEP foi, de até dois ciclos logarítmicos (Figura 26). A diferença no número de células aderidas foi constatada também quando cupons de aço inoxidável foram observados ao microscópio de epifluorescência

(Figura 25) e por microscopia confocal (Figura 27). Células das estirpes selvagens de *A. hydrophila* apresentaram maior frequência de aglomerados (Figura 25 e 27). Esta maior adesão das estirpes selvagens foi observada até às 72 h de incubação (Figura 25).

O fato da estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14, que não acumula AHL, ter apresentado uma menor adesão e não ter formado aglomerados celulares mais espessos até 72 h de incubação confirma a regulação da formação de biofilmes pelo sistema *quorum sensing*. Um fato importante observado foi que a estirpe selvagem *A. hydrophila* ATCC 7966, apesar de possuir o sistema *quorum sensing* comprometido, apresentou número de células aderidas muito semelhante ao da estirpe selvagem *A. hydrophila* Embrapa 029, indicando que a formação de biofilmes pode ser regulada por outros fatores além do sistema *quorum sensing*.

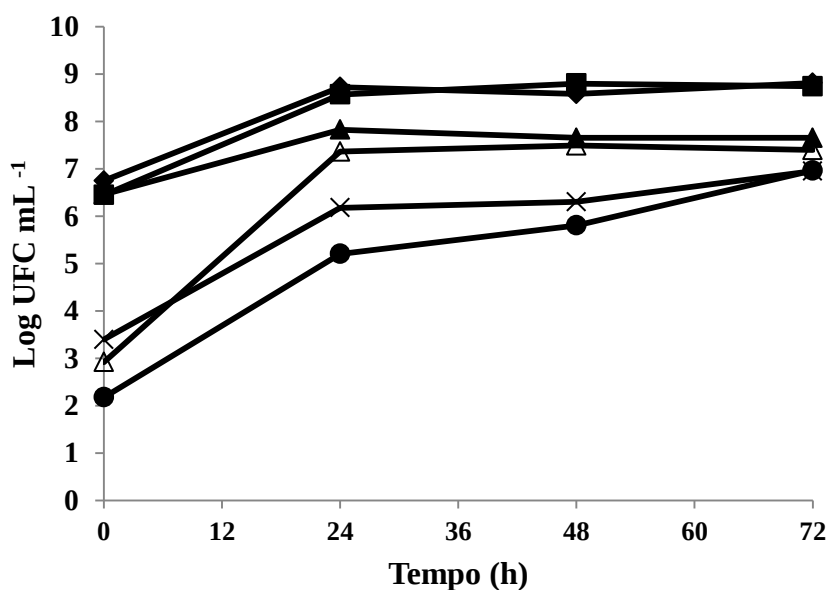


Figura 26 - Logarítmico de UFC mL⁻¹ das estirpes selvagens e mutante de *A. hydrophila* planctônicas e aderidas a cupons de aço inoxidável, cultivadas em TYEP a 30 °C por até 72 h. -◆- *A. hydrophila* Embrapa 029 planctônica, -■- *A. hydrophila* ATCC 7966 planctônica, -▲- *A. hydrophila* 029-14 QS⁻ planctônica, -x- *A. hydrophila* Embrapa 029 aderida, -Δ- *A. hydrophila* ATCC 7966 aderida, -●- *A. hydrophila* 029-14 QS⁻ aderida.

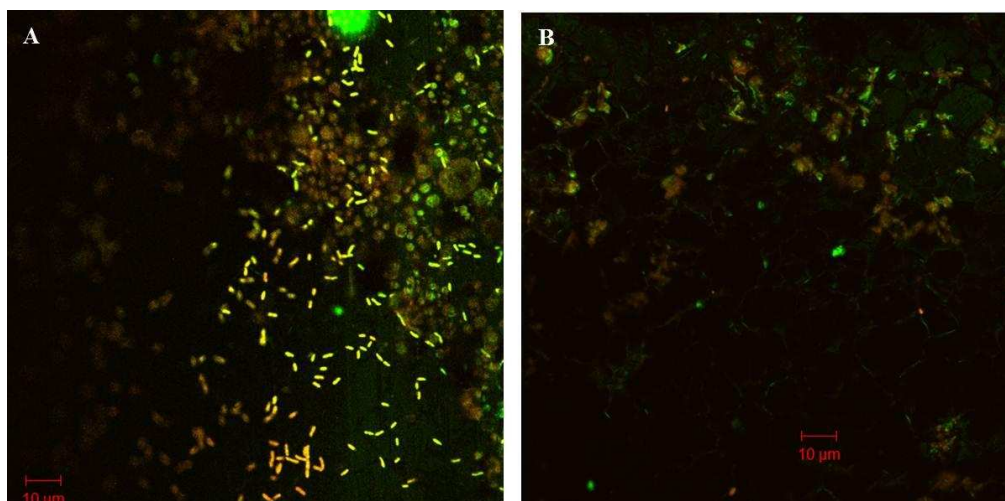


Figura 27 - Micrografias obtidas por microscopia confocal de biofilmes formados por *A. hydrophila* selvagem (A) e mutante QS 029-14 (B) em cupons de aço inoxidável imersos em TYEP e incubados a 30 °C por 48 h, corados com iodeto de propídio e diacetato de fluoresceína.

Lynch et al. (2002) avaliaram a capacidade de *A. hydrophila* AH-1N em formar biofilmes em uma câmara de fluxo contínuo com mutantes isogênicos *ahyI* e *ahyR*. O mutante *ahyI*, que não produz C4-AHL, não foi capaz de formar um biofilme maduro. A alteração na diferenciação do biofilme do mutante *ahyI* foi parcialmente restaurada pela adição de C4-AHL exógena. Não foram observadas diferenças na formação de microcolônias pelo mutante *ahyR* quando comparado à estirpe selvagem e houve um aumento de cerca de 80 % na superfície de cobertura. *A. hydrophila* SSU incapaz de sintetizar AI-2, também apresentou uma arquitetura e dinâmica alteradas da formação de biofilmes (KOZOLOVA et al., 2008). Em duplo mutante *knockout* Δ *ahyRI* de *A. hydrophila* SSU, a formação de biofilme em superfície sólida foi significativamente menor quando comparado à estirpe selvagem (KHAJANCHI et al., 2009).

4.11. Eletroforese e sequenciamento de proteínas

É possível observar diferenças no proteoma extracelular das estirpes de *A. hydrophila* Embrapa 029, ATCC 7966 e mutante QS 029-14 (Figura 28). O maior

número de proteínas observadas em SDS-PAGE no sobrenadante livre de células das estirpes selvagens *A. hydrophila* Embrapa 029 e *A. hydrophila* ATCC 7966 sugerem que o sistema *quorum sensing* está envolvido na regulação da produção de outras proteínas extracelulares, além da protease. Esta ausência de bandas na estirpe mutante QS 029-14 indica a presença de muitas alterações fisiológicas. Uma banda de aproximadamente 31 kDa é observada apenas no sobrenadante livre de células da estirpe *A. hydrophila* Embrapa 029 (Figura 28). Esta banda provavelmente corresponde a uma protease, observada no zimograma de azocaseína. No sobrenadante da estirpe mutante foi observada uma banda muito intensa de aproximadamente 26 kDa que não foi observada nas outras estirpes avaliadas (Figura 28).

Também foi possível observar expressão diferencial no extrato de proteínas intracelulares da estirpe *A. hydrophila* 029 selvagem e mutante QS 029-14 (Figura 29). Este resultado indica que muitas proteínas intracelulares também são possivelmente reguladas por QS.

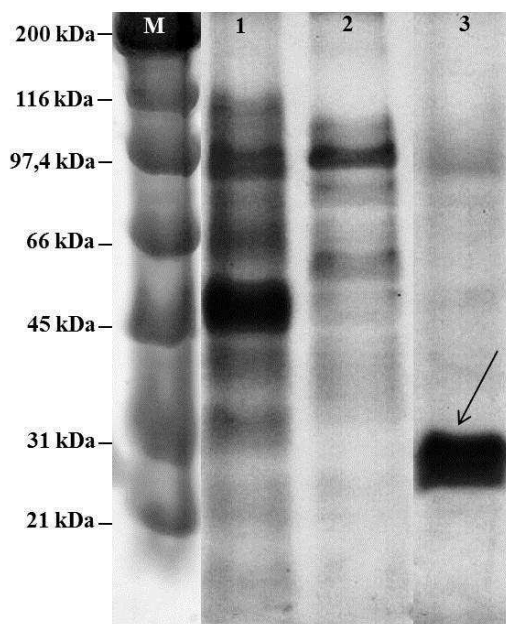


Figura 28 – Perfil de proteínas obtidos em gel SDS-PAGE 12 % do extrato extracelular de *A. hydrophila* selvagem e mutante, padronizado em 10µg de proteínas. (M) 6 µL de marcador de ampla faixa (BioRad); (1) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* Embrapa 029 (10 µg de proteínas); (2) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* ATCC 7966 (10 µg de proteínas); (3) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* 029-14 QS (10 µg de proteínas).

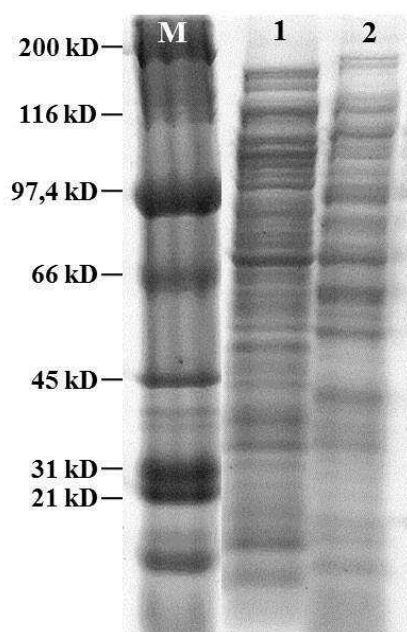


Figura 29 - Perfil de proteínas obtidos em gel SDS-PAGE 12 % do extrato proteico intracelular de *A. hydrophila* selvagem e mutante, padronizado em 3 μ g de proteínas. (M) 6 μ L de marcador de ampla faixa (BioRad); (1) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* Embrapa 029 (3 μ g de proteínas); (2) sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* 029-14 QS⁻ (3 μ g de proteínas).

A proteína presente somente no sobrenadante da estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14, correspondente à banda indicada pela seta na figura 28, foi excisada do gel e preparada para a digestão trípica e análise dos peptídeos por espectrometria de massa. Também foi preparada para a análise da sequência amino-terminal pelo método de Edman. Por análise de espectrometria de massa, poucos picos foram obtidos (Figura 30). O espectro do pico 850. 4838 (Figura 31), cuja sequência obtida foi R L S Y S L P, foi analisada no banco de dados NCBI pelo programa BLAST e trata-se de proteína de efluxo do tipo ABC, específica para macrolídeos, de *A.caviae*.

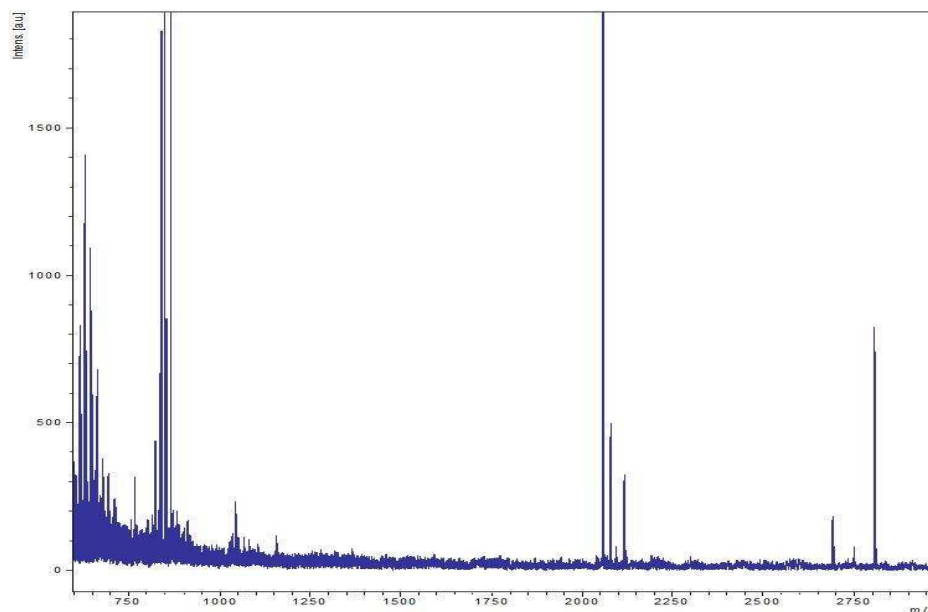


Figura 30 – Espectro geral obtido da análise de peptídeos tripticos da proteína presente no sobrenadante da estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14 por espectrometria de massa.

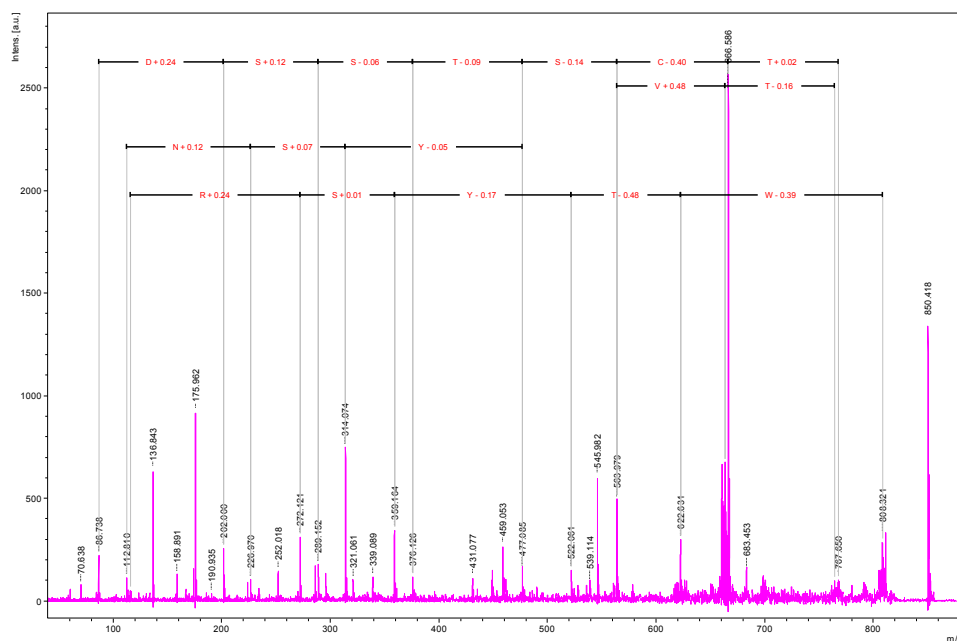


Figura 31 - Espectro correspondente ao peptídeo 850.4838.

O sequenciamento da região N-terminal da proteína pelo método de Edman gerou a sequência de aminoácidos: N P P F G I G G G H H D P A A G G N G (Figura 32). A análise desta sequência em banco de dados ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) revelou tratar-se de uma

sequência instável e com grande número de resíduos apolares. A análise da sequência em banco de dados BLAST indica a ausência de resíduos conservados e também apresentou similaridade com uma porção do transportador ABC de *A. salmonicida*. As análises sugerem que esta proteína diferencialmente expressa seja uma porção do transportador ABC de *Aeromonas*. Entretanto, mais estudos são necessários para se determinar o motivo da presença de uma porção de transportador ABC no extrato extracelular da estirpe *A. hydrophila* mutante QS 029-14.

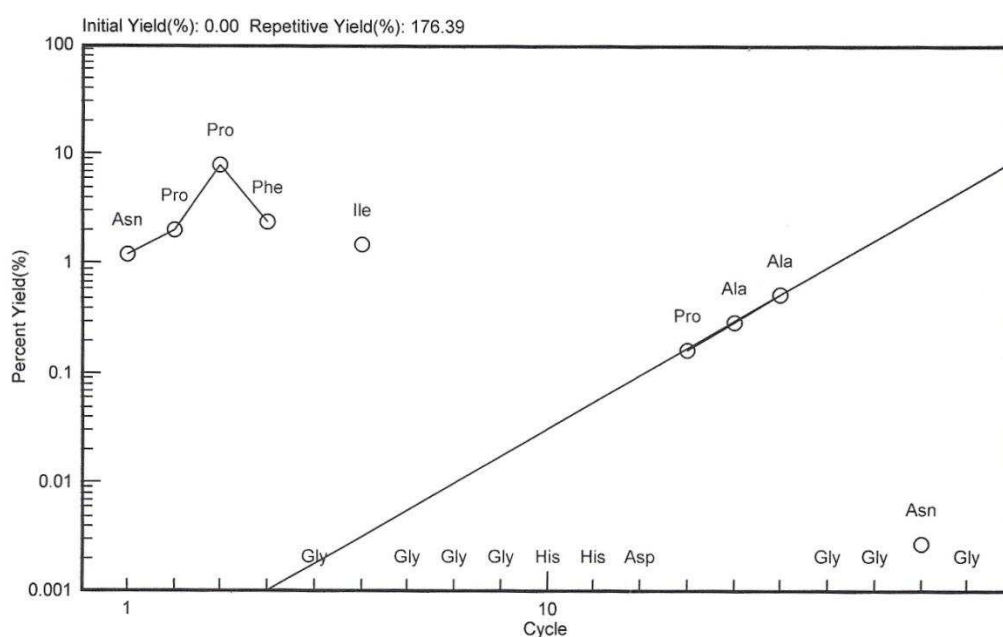


Figura 32 – Gráfico com a sequência de aminoácidos obtido por sequenciamento da região amino-terminal da proteína pelo método de Edman.

5. Conclusões

As estirpes mutantes *A. hydrophila* 029-8, 029-14 e 029-21, construídos utilizando como estratégia a mutação sítio dirigida, apesar de possuírem os genes *ahyI*, *ahyR* e região entre os genes *ahyRI* intactos, não foram capazes de produzir AHLs, e são mutantes com o sistema *quorum sensing* comprometido, ou seja, mutantes QS. As estirpes mutantes apresentam características distintas o que indica que a interrupção / integração ocorreu de maneira diferente nos três mutantes. *A. hydrophila* mutante QS 029-14 é incapaz de transcrever os genes *ahyI* e *ahyR*, sugerindo a presença de alguma alteração na região promotora que impeça a transcrição destes genes. Pode-se ainda sugerir a necessidade de outros fatores de transcrição, o que indica que a regulação do sistema *quorum sensing* em *A. hydrophila* pode ser mais complexa do que o descrito na literatura. A ausência do sistema *quorum sensing*, nos mutantes QS obtidos resultou na perda da atividade de gelatinase, redução ou perda da atividade proteolítica, de β -hemólise, motilidade *swimming* e redução da adesão e formação de biofilme, confirmando que o sistema *quorum sensing* funcional ou a presença do fator ou de fatores de transcrição dos genes *ahyI* e *ahyR* são importantes para estes fenótipos em *A. hydrophila*. Fenótipos como as atividades das enzimas amilase e lipases não foram alterados nos mutantes, indicando que o sistema *quorum sensing* não regula estas atividades hidrolíticas em *A. hydrophila*. A diferença entre o número de proteínas no sobrenadante livre de células e extrato de proteínas intracelulares de *A. hydrophila* selvagem Embrapa 029 e mutante QS 029-14 sugere que o sistema *quorum sensing* pode estar envolvido na regulação de diversas proteínas intracelulares e extracelulares, além das identificadas neste estudo.

6. Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANGUITA, J.; APARICIO, L. B. R.; NAHARRO, G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2411-2417, 1993.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrófilas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 8, n. 8, p. 2250-2255, 2008.
- BANSAL, T.; ENGLERT, D.; LEE, J.; HEGDE, M.; WOOD, T. K.; JAYARAMAN, A. 2007. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. **Infection and Immunity**, v. 75, p.4597–4607, 2007.
- BANSAL, T.; JESUDHASAN, P.; PILLAI, S.; WOOD, T. K.; JAYARAMAN, A. Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p.811–819, 2008.
- BI, Z. X.; LIU, Y. J.; LU, C. P. Contribution of AhyR to virulence of *Aeromonas hydrophila* J-1. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 150-156, 2007.
- BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.
- CAMUS, A. C.; DURBOROW, R. M.; HEMSTREET, W. G.; THUNEL, R. L.; HAWKEL, J.P. *Aeromonas* Bacterial Infections - Motile Aeromonad Septicemia. **Southern Regional Aquaculture Center Publication**, n. 478, p. 1-4, 1998.
- CHAN, KG.; PUTHUCHEARY, S. D.; CHAN, XY.; YIN, WF.; WONG, CS.; TOO, WS. S.; CHUA, KH. Quorum Sensing in *Aeromonas* species isolated from patients in Malaysia. **Current Microbiology**, v. 62, n.1, p. 167-172, 2011.

- CHOI, J.; SHIN, D.; RYU, S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 4885–4890, 2007.
- 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.
- CHUANG, Y. C.; CHIOU, S. F.; SU, J. H.; WU, M. L.; CHANG, M. C. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 803-812, 1997.
- DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, p. 474-483, 2006.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6640-6645, 2000.
- DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1239-1247, 2005.
- 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 sensor. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 250 – 254, 2002.
- DE KIEVIT, T. D. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4839–4849, 2000.
- DERBISE, A.; LESIC, B.; DACHEUX, D.; GHIGO, J. M.; CARNIEL, E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, p. 113-116, 2003.
- DIGGLE, S. P.; CRUSZ, S. A.; CÁMARA, M. Primer: Quorum sensing. **Current Biology**, v. 17, n. 21, p. 907-910, 2007.
- FENGQING, H.; SONG, Y. Electroporation-mediated transformation of *Aeromonas hydrophila*. **Plasmid**, v. 54, n. 3, p. 283-287, 2005.
- FLAVIER, A. B.; CLOUGH S. J.; SCHELL M. A.; DENNY T. Y. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. **Molecular Microbiology**, v. 26, p. 251-259, 1997.

- FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, v. 35, p. 439-468, 2001.
- 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 Microbiology**, v. 50, p.727-751, 1996.
- GOBAT, P., & JEMMI, T. Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, 20, 117–120, 1993.
- GÖRG, A. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**. Handbooks GE Healthcare, 162p., 2004.
- HABA, E.; BRESCO, O.; FERRER, C.; MARQUÉ, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 40–44, 2000.
- HOLDEM, M. T. G.; CHABRA, 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. 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.
- HUSSEINY, M. I.; HENSEL, M: Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine carrier strains. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1598-1605, 2005.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 3, p. 23-28, 1990.
- JANGID, K.; KONG, R.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. *luxRI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 93-101, 2007.
- JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 10, p. 145-167, 2008.
- 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.

- KANIGA, K.; DELOR, I.; CORNELIS, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. **Gene**, v. 109, p. 137-141, 1991.
- KHAJANCHI, B. K.; SHA, J.; KOZLOVA, E. V.; EROVA, T. E.; SUAREZ, G.; SIERRA, J. C.; POPOV, V. L.; HORNE MAN, A. J.; CHOPRA, A. K. N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, v. 155, p. 3518–3531, 2009.
- KIRKE, D.; SWIFT, S.; LYNCH, M. J.; WILLIAMS, P. The *Aeromonas hydrophila* LuxR homologue AhyR regulates the N-acyl homoserine lactone synthase, AhyI positively and negatively in a growth phase-dependent manner. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, p. 109–117, 2004.
- KOZLOVA, E. V.; POPOV, V. L.; DHA, J.; FOLTZ, S. M.; EROVA, T. E.; AGAR, S. L.; HORNE MA, A. J.; CHOPRA, A. K. Mutation in the S-ribosylhomocysteinase (*luxS*) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 343-354, 2008.
- KOZLOVA, E. V.; KHAJANCHI, B. K.; SHA, J.; CHOPRA, A. K. Quorum sensing and c-di-GMP-dependent alterations in gene transcripts and virulence-associated phenotypes in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, *in press*, p. 1-11, 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.
- LESIC, B.; RAHME, L.G. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Molecular Biology**, v. 20, p. 1-9, 2008.
- LOUREIRO, M. E.; RAMOS, H. J. O.; SOARES, C. Q.; MESQUITA, R. O.; BARROS, E. **Uso da espectrometria de massa na análise do proteoma**. In “Curso: Uso da espectrometria de massa na análise do proteoma”. 28 p., 2010.
- 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.
- MARTINS, M. L. **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quorum sensing em bactérias psicrófilas isoladas de leite**. 171p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

- 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**, v. 112, p. 244-252, 2006 .
- MICHAEL, B.; SMITH, J.N.; SWIFT, S.; HEFFRON, F.; AHMER, B.M. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5733–5742, 2001.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.
- MORAL, C. H.; CASTILLO, E. F.; FIERRO, P. L.; CORTÉS, A. V.; CASTILLO, J. A.; SORIANO, A. C.; SALAZAR, M. S.; PERALTA, B. R.; CARRASCO, G. N. Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila* *aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 1813-1821, 1998.
- MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. APHA, cap. 16, p. 183-193, 2001.
- MURANO, E. A.; HUDNALL, J. A. Media, Reagents, and Stains. In: DOWNES, F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. APHA, cap. 63, p. 601-648, 2001.
- MURRAY, R. G. E., BRENNER, C. D. J., BRYANT, M. P., HOLT, J. G., KRIEG, N. R., MOULDER, J. W., PFENNIG, N., SNEATH, P. H. A. STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, p. 465-469, 1983.
- NEELAMBARI, V.; VASANTHABHARATHI, V.; BALASUBRAMANIAN, R.; JAYALAKSHMI, S. Lipase from marine *Aeromonas hydrophila*. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n.8, p. 658-668, 2011.
- PANDEY, A.; NAIK, M.; DUBEY, S. K. Hemolysin, protease, and eps producing pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain An4 shows antibacterial activity against marine bacterial fish pathogens. **Journal of Marine Biology**, p. 1-9, 2010.
- 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.
- PESCI, E. C.; MILBANK, J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KEDE, A. S.; GREENBERG, E. P.; IGWLEWSKI, B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 6, p. 11229-11264, 1999.

- PINTO, U.M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, v. 18, p. 1322-1327, 2007.
- PLATT, T. G.; FUQUA, C. What's in a name? The semantics of quorum sensing. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 383-387, 2010.
- RANALLO, R. T.; BARNOY, S.; THAKKAR, S.; URICK, T.; VENKATESAN, M. M. Developping live Shigella vaccines using λ red recombineering. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 462-469, 2006.
- RIBEIRO, R. V. *Aeromonas*: aspectos gerais, clínicos e epidemiológicos. In: **Boletim de Divulgação Técnica e Científica - Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária / SCZ**, v. 2, n. 8, p.6, 2000.
- ROSSI, M. S.; PAQUELIN, A.; GHIGO, J. M.; WANDERSMAN, C: Haemophoremediated signal transduction across the bacterial cell envelope in *Serratia marcescens*: the inducer and the transported substrate are different molecules. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1467-1480, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T.E. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. New York, 1989.
- SESHADRI, R.; JOSEPH, S. W.; CHOPRA, A. K.; SHA, J.; SHAW, J.; GRAF, J.; HAFT, D.; WU, M.; REN, Q.; ROSOVITZ, M. J.; MADUPU, R.; TALLON, L.; KIM, M.; JIN, S.; VOUNG, H.; STINE, C.; ALI, A.; HORNEMAN, A. J.; HEIDELBERG, J. H. Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of All Trades. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 23, p. 8272-8282, 2006.
- 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.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OSLEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.
- SINGH, V.; SOMVANSI, P.; RATHORE, G.; KAPOOR, D.; MISHRA, B. N. Gene cloning, expression and homology modeling of hemolysin gene from *Aeromonas hydrophila*. **Protein Expression and Purification**, v. 65, p. 1-7, 2009.
- 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.

- SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 56–60, 2003.
- SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; GIRON, 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.
- SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; JARVIS, B.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Bacteria–host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.100, p. 8951–8956, 2003
- STAMFORD, T. L. M., ARAÚJO, J.M., STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4 ,1998.
- STEIDLE, A.; SIGL, K.; SCHUHEGGER, R.; IHRING, A.; SCHMID, M.; GANTNER, S.; STOFFELS, M.; RIEDEL, K.; GIVSKOV, M.; HARTMANN, A.; LANGEBARTELS, C.; EBERL, L. Visualization of *N*-acyl homoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5761-5770, 2001.
- STEINDLER, L.; VENTURI, V. Detection of quorum-sensing *N*-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, p. 1-9, 2007.
- SCHWENTEIT, J.; GRAM, L.; NIELSEN, K. F.; FRIDJONSSON, O. H.; BORNSCHEUER, U. T.; GIVSKOV, M.; GUDMUNDSDOTTIR, B. K. Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* and the effect of the autoinducer synthase AsaI on bacterial virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 389–397, 2011.
- SWIFT, S.; KARLYSHEV, A. V.; FISH, L.; DURANT, E. L.; WINDON, M. K.; CHHABRA, S. R.; WILLIAMS, P.; MACINTYRE, S.; STEWART, G. S. A. B. 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, n. 17, p. 5271-5281, 1997.
- SWIFT, S.; LYNCH, M. J.; FISH, L.; KIRKE, D. F.; TOMÉS, J. M.; STEWART, G. S. A. B.; WILLIAMS, P. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5192-5199, 1999.
- 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. 199-270, 2001.

- TAGA, M. E.; BASSLER, B.L. Chemical communication among bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 100, p. 14549-14554, 2003.
- TOWBIN, H.; STAEBELINT, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 76, n.9, p. 4350-4354, 1979.
- WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 125–131, 2006.
- WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. **Microbiology**, v. 153, p.3923–3938, 2007.
- WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 182–191, 2009.
- WHITE, C.; WINANS, S. C. Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, p. 1135-1148, 2001.
- 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.
- YAMAMOTO, S.; IZUMIYA, H.; MORITA, M.; ARAKAWA, E.; WATANABE, H: Application of lambda Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. **Gene**, v. 438, p. 57-64, 2009.

APÊNDICE

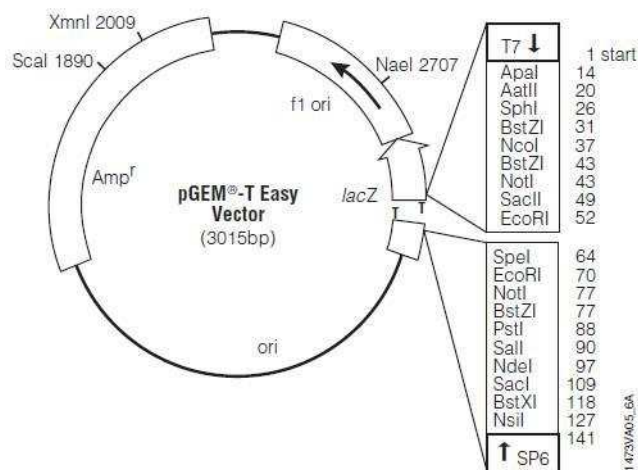


Figura 1 – Mapa do vetor pGEM[®]-T Easy (Fonte: Manual Promega).

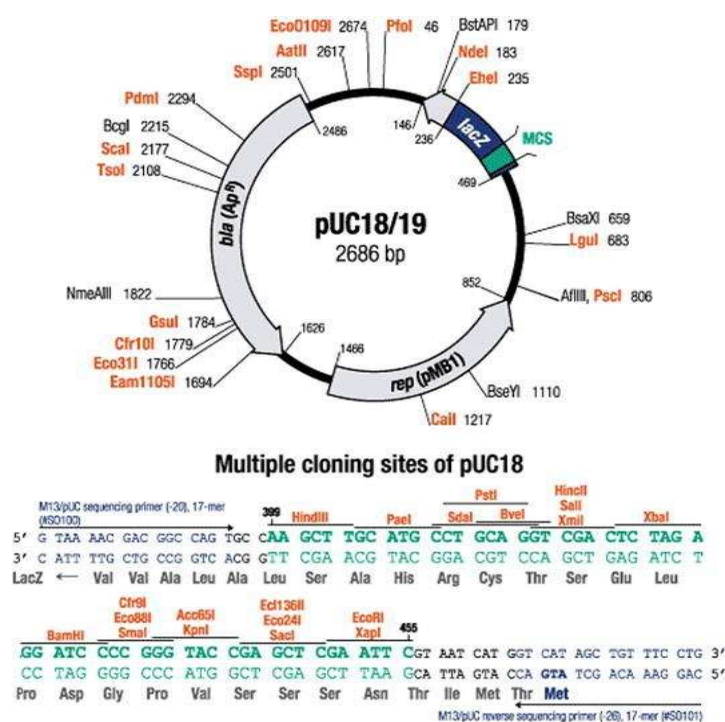
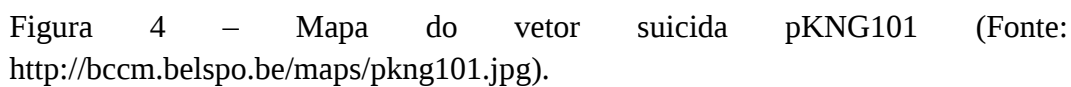


Figura 2 – Mapa do vetor pUC18/19 (Fonte: Manual Fermentas).



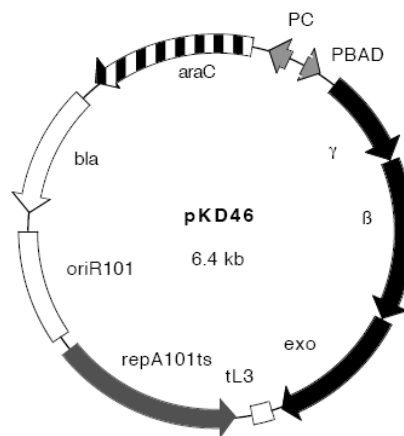


Figura 5 – Mapa do vetor suicida pKD46. Os vetores pKD78 e pKD119, possuem genes que codificam resistência a cloranfenicol e tetraciclina, respectivamente (Fonte: <http://2008.igem.org/wiki/images/d/d0/PKD46.png>).

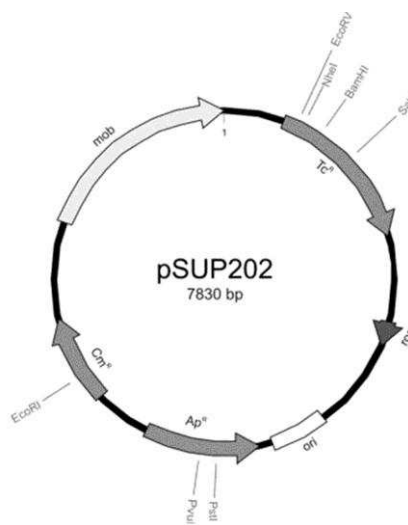
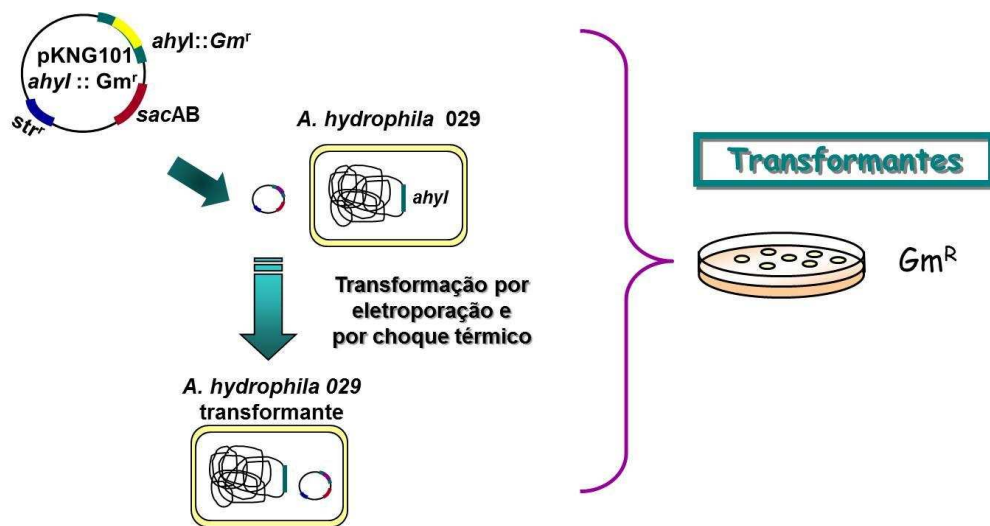


Figura 6 – Mapa do vetor suicida pSUP202 (ROSCHANKI e STRAUCH, 2011).



(Swift et al., 1999)

Figura 7 – Esquema da construção de *A. hydrophila* mutante Δ ahyI.

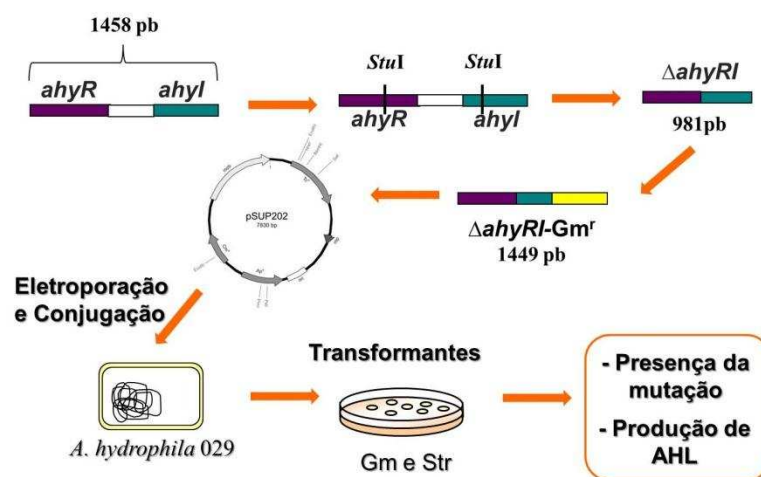


Figura 8 – Esquema da construção de *A. hydrophila* mutante Δ ahyRI.

ATCC	2	CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA	61
029	1	CGGCT-ACTCCGTG-CAGCAGCCGCGTAATACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA	58
ATCC	62	CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAAC	121
029	59	CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAAC	118
ATCC	122	CTGGGAATTGCATTTAAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAATTCAGG	181
029	119	CTGGGAATTGCATTTAAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAATTCAGG	178
ATCC	182	TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG	241
029	179	TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG-CCCCCTGG	237
ATCC	242	ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTTGTA	301
029	238	ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTTGTA	297
ATCC	302	GTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCT	361
029	298	GTCCACGCCGTAAACGATGTC-ATTTGAGGCTGTGTCCTT-AGACGTGGCTTCCGGAGCT	355
ATCC	362	AACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGCGCGCAAGGTTAAAACTC-----AAATGA	416
029	356	AACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGCGCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAA-T--	412
ATCC	417	ATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACCGGAAGAA	476
029	413	-T-GACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACCGGAAGAA	470
ATCC	477	CCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAATC	536
029	471	CCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATC	530
ATCC	537	AGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTGA-GTCCC	595
029	531	AGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTGAAGTCCC	590
ATCC	596	GCAACGAGCGCAACCCCTG	614
029	591	GCAACGAGCGCAACCCCTG	609

Figura 9 – Alinhamento entre sequências de rDNA 16S de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. hydrophila* Embrapa 029 utilizando primer direto.

ATCC	1	CGGGA-TTA-CCAACATCTTACAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTC	58
029	5	CGGGACTTACCAACATCTCAC-GACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTC	63
ATCC	59	TGATTCCCGAAGGCACTCCCGTATCTCTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAG	118
029	64	TGATTCCCGAAGGCACTCCCGCATCTCTGAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAG	123
ATCC	119	GTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA	178
029	124	GTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA	183
ATCC	179	TTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGATTAAACGCGTTAGCT	238
029	184	TTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGATTAAACGCGTTAGCT	243
ATCC	239	CCGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC	298
029	244	CCGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC	303
ATCC	299	CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCA	358
029	304	CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCA	363

Continuação da figura 10

ATCC	359	GGGGGCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTCACCTGG	418
029	364	GGGGGCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTCACCTGG	423
ATCC	419	AATTCTACCCCCCTCTACAGACTCTAGCTGGACAGTTTTAAATGCAATTCCCAGGTTGAG	478
029	424	AATTCTACCCCCCTCTACAGACTCT-GCTGGAC-GTTTTAAATGCAATTCCCAGGTTGAG	481
ATCC	479	CCCGGGGCTTTCACATCTACTTATCCACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAA-TTCC	537
029	482	CCCGGGGCTTTCACATCTACTTATCCACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAAATTCC	541
ATCC	538	GATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTGCCGGTGCTTCT	597
029	542	GATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTGCCGGTGCTTCT	601
ATCC	598	TCTGCGAGTAAACGTCACAGTTGATACGTATA	629
029	602	TCTGCGAGTAA-CGTC-CAGTT-ATACGTATA	630

Figura 10 – Alinhamento entre sequências de rDNA 16S de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. hydrophila* Embrapa 029 utilizando primer reverso.

029	1	GTTTCGCGCGCCTCGTCATAGGCACCTGTCAGGGGCTGGCCGACGGCACGGGCGAAACGCT	60
ATCC	590646	GTTTCGCGCGCCTCGTCATAGGCACCTGTCAGGGGCTGGCCGACGGCACGGGCGAAACGCT	590705
029	61	CATCCAGATGGAAGCGGATCCCGACCCGCGCACGGCGCCCAGATCCACCGCTGCGGGT	120
ATCC	590706	CATCCAGATGGAAGCGGATCCCGACCCGCGCACGGCGCCCAGATCCACCGCTGCGGGT	590765
029	121	GACCGAGCCGCTCGATGGGCAGGCCGAGACGGCGGAAGATCCGCTCTACCGGCAGGCTGA	180
ATCC	590766	GACCGAGCCGTTTCGATGGGCAGGCCGAGACGGCGGAAGATCCGCTCCACCGGCAGGCTGA	590825
029	181	CCACGGCAACCAGTTCGCGGATCCCCGTCGCGCTTGCGCAAAGGCATAGACCTCGCGGAAGA	240
ATCC	590826	CCACGGCAACCAGTTCGCGGATCCCCGTCGCGCTTGCGCAAAGGCATAGACCTCGCGGAAGA	590885
029	241	TGATGCAGGTCAGTTCGCTGATGCCGTTGCCGAGCCGGGGGCGCCGTTTCGGCATCGATGG	300
ATCC	590886	TGATGCAGGTCAGTTCGCTGATGCCGTTGCCGAGCCGGGGAGCCCGTTTCGGCATCGATGG	590945
029	301	CGAGGCGGGTCAGCTCCACACGTCGTTGCTGCGCGCGGGGCTTCACCGGCAGGGCGG	360
ATCC	590946	CGAGGCGGGTCAGCTCCACACGTCGTTGCTGCGCGCGGGGCTTCACCGGCAGGGCGG	591005
029	361	TGGGGAAGATGCTGGGCAGCATGTAATCCTGGGCACAGCTGAGCAGACGGATGCAGCCGC	420
ATCC	591006	TGGGGAAGATGCTGGGCAGCATGTAATCCTGGGCACAGCTGAGCAGACGGATGCAGCCGC	591065
029	421	ACAGGCCTTCCTCGTCTTCGATCAGACCCAGTGGGTATCAGGGGTATCGAAACTGTCCT	480
ATCC	591066	ACAGGCCTTCCTCGTCTTCGATCAGACCCAGTGGGTATCAGGGGTATCGAAACTGTCCT	591125
029	481	GCTCCAGACCACGGTGGGATTCCACATCCCAGCCGAGGCGATCGGAGAAGACGCGATTGC	540
ATCC	591126	GCTCCAGACCACGGTGGGATTCCACATCCCAGCCGAGGCGATCGGAGAAGACGCGATTGC	591185
029	541	GAAAGCGATAAAGCTCGTTTTCTACCTCCCATCTGGG	577
ATCC	591186	GAAAGCGATAAAGCTCGTTTTCTACCTCCCATCTGGG	591222

Figura 11 – Alinhamento entre sequências do gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e *A. hydrophila* ATCC 7966.

029	1	GTTCGCGCGCCTCGTCATAGGCACCCTGCAGGGGCTGGCCGACGGCACGGGCGAAACGCT	60
SSU	610	GTTCGCGCGCCTCGTCATAGGCACCCTGCAGGGGCTGACCGACGGCACGGGCGAAACGCT	551
029	61	CATCCAGATGGAAGCGGATCCCCACCCCGCGCACGGCGCCAGATCCACCGCTGGCGGT	120
SSU	550	CGTCCAGATGGAAGCGGATCCCCACCCCGCGCACGGCGCCAGATCCACCGCTGGCGGT	499
029	121	GACCGAGCCGCTCGATGGGCAGGCCGAGACGGCGGAAGATCCGCTCTACCGGCAGGCTGA	180
SSU	490	GACCGAGCCGCTCGATGGGCAGGCCGAGGCGGGCGGAAGATCCGCTCTACCGGCAGGCTGA	431
029	181	CCACGGCAACCAGTTCGCGGATCCCCTGCGCCTTGCCAAAGGCATAGACCTCGCGGAAGA	240
SSU	430	CCACGGCAACCAGTTCGCGGATCCCCTGCGCCTTGCCGAAGGCATAGACCTCGCGGAAGA	371
029	241	TGATGCAGGTCAGTTTCGCTGATGCCGTTGCCGAGCCGGGGGCCCGTTTCGGCATCGATGG	300
SSU	370	TGACGCAGGTCAGTTCGCTGACCCCGTTGCCAGGCGGGCGCCCGTTTCGGCATCGATGG	311
029	301	CGAGGCGGGTCAGTCCCACACGTCGTTGCTGCGCGGGGGGCTTCACCGGCGAGGGCGG	360
SSU	310	CGAGGCGGGTCAGTCCCACACGTCGTTGCTGCGTGGTGGGGCTTCGCGGCGAGGGCGG	251
029	361	TGGGGAAGATGCTGGGCAGCATGTAATCCTGGGCACAGCTGAGCAGACGGATGCAGCCGC	420
SSU	250	TGGGGAAGATGCTGGGCAGCATGTAATCCTGGGCACAACTGAGCAGACGAATGCAGCCGC	191
029	421	ACAGGCCTTCCTCGTCTTCGATCAGCACCCAGTGGGTATCAGGGGTATCGAAACTGTCT	480
SSU	190	ACAGGCCTGAGTCGTCTTCAATCAGAACCAGTGGGTGTCCGAGTATCGAAACTGTCT	131
029	481	GCTCCAGACCACGGTGGGATTCCACATCCCAGCCGAGGCGATCGGAGAAGACGCGATTGC	540
SSU	130	GCTCCAGACCACGGTGAGATTCCACATCCCAGCCGAGGCGATCGGAGAAGACGCGATTGC	71
029	541	GAAAGCGATAAAGCTCGTTTTCTACCTCCCATCTGGG	577
SSU	70	GAAAGCGATAAAGCTCGTTTTCTACCTCCCATCTGGG	34

Figura 12 – Alinhamento entre sequências do gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e *A. hydrophila* SSU.

Continuação da figura 13

029	421	ACAGGCCTTCCTCGTCTTCGATCAGCACCCAGTGGGTATCAGGGGTATCGAAACTGTCCT	480
AN-1	421	ACAGGCCTTCCTCGTCTTCGATCAGCACCCAGTGGGTATCAGGGGTATCGAAACTGTCCT	480
029	481	GCTCCAGACCACGGTGGGATTCCACATCCCAGCCGAGGCGATCGGAGAAGACGCGATTGC	540
AN-1	481	GCTCCAGACCACGGTGGGATTCCACATCCCAGCCGAGGCGATCGGAGAAGACGCGATTGC	540
029	541	GAAAGCGATAAAGCTCGTTTTCTACCTCCCATCTGGG	577
AN-1	541	GAAAGCGATAAAGCTCGTTTTCTACCTCCCATCTGGG	577

Figura 13 – Alinhamento entre sequências do gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e *A. hydrophila* AN-1.

	*
#ATCC7966_rDNA16S_F	GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATA CGG AGG GTG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	GTG - CA GCA GCC GCG GTA ATA CGG AGG GTG
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATA CGG AGG GTG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATA CGG AGG GTG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATA CGG AGG GTG
#ATCC7966_rDNA16S_F	CAA GCG TTA ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	CAA GCG TTA ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	CAA GCG TTA ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	CAA GCG TTA ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	CAA GCG TTA ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA
#ATCC7966_rDNA16S_F	GCG CAC GCA GGC GGT TGG ATA AGT TAG ATG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	GCG CAC GCA GGC GGT TGG ATA AGT TAG ATG
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	GCG CAC GCA GGC GGT TGG ATA AGT TAG ATG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	GCG CAC GCA GGC GGT TGG ATA AGT TAG ATG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	GCG CAC GCA GGC GGT TGG ATA AGT TAG ATG
#ATCC7966_rDNA16S_F	TGA AAG CCC CGG GCT CAA CCT GGG AAT TGC
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	TGA AAG CCC CGG GCT CAA CCT GGG AAT TGC
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	TGA AAG CCC CGG GCT CAA CCT GGG AAT TGC
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	TGA AAG CCC CGG GCT CAA CCT GGG AAT TGC
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	TGA AAG CCC CGG GCT CAA CCT GGG AAT TGC
#ATCC7966_rDNA16S_F	ATT TAA AAC TGT CCA GCT AGA GTC TTG TAG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	ATT TAA AAC TGT CCA GCT AGA GTC TTG TAG
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	ATT TAA AAC TGT CCA GCT AGA GTC TTG TAG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	ATT TAA AAC TGT CCA GCT AGA GTC TTG TAG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	ATT TAA AAC TGT CCA GCT AGA GTC TTG TAG
#ATCC7966_rDNA16S_F	AGG GGG GTA GAA TTC CAG GTG TAG CGG TGA
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	AGG GGG GTA GAA TTC CAG GTG TAG CGG TGA
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	AGG GGG GTA GAA TTC CAG GTG TAG CGG TGA
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	AGG GGG GTA GAA TTC CAG GTG TAG CGG TGA
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	AGG GGG GTA GAA TTC CAG GTG TAG CGG TGA

Continuação da figura 14

#ATCC7966_rDNA16S_F	AAT GCG TAG AGA TCT GGA GGA ATA CCG GTG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	AAT GCG TAG AGA TCT GGA GGA ATA CCG GTG
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	AAT GCG TAG AGA TCT GGA GGA ATA CCG GTG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	AAT GCG TAG AGA TCT GGA GGA ATA CCG GTG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	AAT GCG TAG AGA TCT GGA GGA ATA CCG GTG
#ATCC7966_rDNA16S_F	GCG AAG GCG GCC CCC TGG ACA AAG ACT GAC
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	GCG AAG GCG GCC CCC TGG ACA AAG ACT GAC
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	GCG AAG GCG GCC CCC TGG ACA AAG ACT GAC
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	GCG AAG GCG GCC CCC TGG ACA AAG ACT GAC
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	GCG AAG GCG GCC CCC TGG ACA AAG ACT GAC
#ATCC7966_rDNA16S_F	GCT CAG GTG CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	GCT CAG GTG CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	GCT CAG GTG CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	GCT CAG GTG CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	GCT CAG GTG CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA
#ATCC7966_rDNA16S_F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CAC GCC GTA
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CAC GCC GTA
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CAC GCC GTA
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CAC GCC GTA
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CAC GCC GTA
	* * *
#ATCC7966_rDNA16S_F	AAC GAT GTC GAT TTG GAG GCT GTG TCC TTG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	- AC GAT GTC - AT TTG GAG GCT GTG TCC TT -
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	AAC GAT GTC GAT TTG GAG GCT GTG TCC TTG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	AAC GAT GTC GAT TTG GAG GCT GTG TCC TTG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	AAC GAT GTC GAT TTG GAG GCT GTG TCC TTG
#ATCC7966_rDNA16S_F	AGA CGT GGC TTC CGG AGC TAA CGC GTT AAA
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	AGA CGT GGC TTC CGG AGC TAA CGC GTT AAA
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	AGA CGT GGC TTC CGG AGC TAA CGC GTT AAA
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	AGA CGT GGC TTC CGG AGC TAA CGC GTT AAA
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	AGA CGT GGC TTC CGG AGC TAA CGC GTT AAA
#ATCC7966_rDNA16S_F	TCG ACC GCC TGG GGA GTA CGG CCG CAA GGT
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	TCG ACC GCC TGG GGA GTA CGG CCG CAA GGT
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	TCG ACC GCC TGG GGA GTA CGG CCG CAA GGT
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	TCG ACC GCC TGG GGA GTA CGG CCG CAA GGT
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	TCG ACC GCC TGG GGA GTA CGG CCG CAA GGT
#ATCC7966_rDNA16S_F	TAA AAC TCA AAT GAA TTG ACG GGG GCC CGC
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	TAA AAC TCA AAT GAA TTG ACG GGG GCC CGC
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	TAA AAC TCA AAT GAA TTG ACG GGG GCC CGC
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	TAA AAC TCA AAT GAA TTG ACG GGG GCC CGC
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	TAA AAC TCA AAT GAA TTG ACG GGG GCC CGC

Continuação da figura 14

#ATCC7966_rDNA16S_F	ACA AGC GGT GGA GCA TGT GGT TTA ATT CGA
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	ACA AGC GGT GGA GCA TGT GGT TTA ATT CGA
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	ACA AGC GGT GGA GCA TGT GGT TTA ATT CGA
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	ACA AGC GGT GGA GCA TGT GGT TTA ATT CGA
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	ACA AGC GGT GGA GCA TGT GGT TTA ATT CGA
#ATCC7966_rDNA16S_F	TGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC TGG CCT TGA
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	TGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC TGG CCT TGA
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	TGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC TGG CCT TGA
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	TGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC TGG CCT TGA
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	TGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC TGG CCT TGA
#ATCC7966_rDNA16S_F	CAT GTC TGG AAT CCT GCA GAG ATG CGG GAG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	CAT GTC TGG AAT CCT GTA GAG ATA CGG GAG
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	CAT GTC TGG AAT CCT GTA GAG ATA CGG GAG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	CAT GTC TGG AAT CCT GTA GAG ATA CGG GAG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	CAT GTC TGG AAT CCT GTA GAG ATA CGG GAG
#ATCC7966_rDNA16S_F	TGC CTT CGG GAA TCA GAA CAC AGG TGC TGC
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	TGC CTT CGG GAA TCA GAA CAC AGG TGC TGC
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	TGC CTT CGG GAA TCA GAA CAC AGG TGC TGC
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	TGC CTT CGG GAA TCA GAA CAC AGG TGC TGC
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	TGC CTT CGG GAA TCA GAA CAC AGG TGC TGC
#ATCC7966_rDNA16S_F	ATG GCT GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG ATG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	ATG GCT GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG ATG
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	ATG GCT GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG ATG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	ATG GCT GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG ATG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	ATG GCT GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG ATG
	*
#ATCC7966_rDNA16S_F	TTG GGT TAA GTC CCG CAA CGA GCG CAA CCC
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	TTG GGT TA - GTC CCG CAA CGA GCG CAA CCC
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	TTG GGT TAA GTC CCG CAA CGA GCG CAA CCC
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	TTG GGT TAA GTC CCG CAA CGA GCG CAA CCC
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	TTG GGT TAA GTC CCG CAA CGA GCG CAA CCC
#ATCC7966_rDNA16S_F	CTG
#A._hydrophila_029_rDNA16S_F	CTG
#A._hydrophila_029-08_rDNA16S_F	CTG
#A._hydrophila_029-14_rDNA16S_F	CTG
#A._hydrophila_029-21_rDNA16S_F	CTG

Figura 14 – Alinhamento entre sequências de rDNA 16S de *A. hydrophila* ATCC 7966, Embrapa 029 e estirpes mutantes.

#A._hydrophila_029_ahyI_F	GCT GGC CGA CGG CAC GGG CGA AAC GCT - CA
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	GCT GGC CGA CGG CAC GGG CG - AAC GCT CCA
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	GCT GGC CGA AGG CAC GGG CG - A ? C GCT - ?A
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	GCT GGC CGA CGG CAC GGG CG - AAC GCT - CA
#A._hydrophila_029_ahyI_F	T - C CAG ATG GAA GCG GAT -CC CGA CCC CGC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	TCC CAG ATG GAA GCG GAT CCC CGA CCC CGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	T - C CAG ATG GAA GCG GAT -GC CGA CCC CGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	T - C CAG ATG GAA GCG GAT -CC CGA CCC CGC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	GCA CGG CGC CCA GAT CCA CCG CCT GGC GGT
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	GCA CGG CGC CCA GAT CCA CCG CCT GGC GGT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	GCA CGG CGC T - A GAG CCC -CG CCT GGC GGT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	GCA CGG CGC CCA GAT CCA CCG CCT GGC GGT
#A._hydrophila_029_ahyI_F	GAC CGA GCC GCT CGA TGG GCA GGC CGA GAC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	GAC CGA GCC GCT CGA TGG GCA GGC CGA GAC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	GAG CGA GCC GCT CGA GGG GCA GGC CGA GAG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	GAC CGA GCC GCT CGA TGG GCA GGC CGA GAC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	GGC GGA AGA TCC GCT CTA CCG GCA GGC TGA
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	GGC GGA AGA TCC GCT CTA CCG GCA GGC TGA
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	GGC GGA GGA TCC GCT CTA CCG GCA GGC TGA
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	GGC GGA AGA TCC GCT CTA CCG GCA GGC TGA
#A._hydrophila_029_ahyI_F	CCA CGG CAA CCA GTT CGC GGA TCC CCT GCG
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	CCA CGG CAA CCA GTT CGC GGA TCC CCT GCG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	CCA CGG CAA CCA GTT CGC GGA TCC C-T GCG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	CCA CGG CAA CCA GTT CGC GGA TCC CCT GCG
#A._hydrophila_029_ahyI_F	CCT TGG CAA AGG CAT AGA CCT CGC GGA AGA
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	CCT TGG CAA AGG CAT AGA CCT CGC GGA AGA
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	CCT TGG CAA AGG CAT AGA CCT CGC GGA GGA
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	CCT TGG CAA AGG CAT AGA CCT CGC GGA AGA
#A._hydrophila_029_ahyI_F	TGA TGC AGG TCA GTT CGC TGA TGC CGT TGC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	TGA TGC AGG TCA GTT CGC TGA TGC CGT TGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	TGA TGC AGG TCA GTT CGC TGA TGC CGT TGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	TGA TGC AGG TCA GTT CGC TGA TGC CGT TGC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	CGA GCC GGG GGG CCC GTT CGG CAT CGA TGG
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	CGA GCC GGG GGG CCC GTT CGG CAT CGA TGG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	CGA GCC GGG GGG CCC GTT CGG CAT CGA TGG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	CGA GCC GGG GGG CCC GTT CGG CAT CGA TGG
#A._hydrophila_029_ahyI_F	CGA GGC GGG TCA GCT CCC ACA CGT CGT TGC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	CGA GGC GGG TCA GCT CCC ACA CGT CGT TGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	CGA GGC GGG TCA GCT CCC ACA CGT CGT TGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	CGA GGC GGG TCA GCT CCC ACA CGT CGT TGC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	TGC GCG GCG GGG CTT CAC CGG CGA GGG CGG
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	TGC GCG GCG GGG CTT CAC CGG CGA GGG CGG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	TGC GCG GCG GGG CTT CAC CGG CGA GGG CGG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	TGC GCG GCG GGG CTT CAC CGG CGA GGG CGG

Continuação da figura 15

#A._hydrophila_029_ahyI_F	TGG GGA AGA TGC TGG GCA GCA TGT AAT CCT
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	TGG GGA AGA TGC TGG GCA GCA TGT AAT CCT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	TGG GGA AGA TGC TGG GCA GCA TGT AAT CCT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	TGG GGA AGA TGC TGG GCA GCA TGT AAT CCT
#A._hydrophila_029_ahyI_F	GGG CAC AGC TGA GCA GAC GGA TGC AGC CGC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	GGG CAC AGC TGA GCA GAC GGA TGC AGC CGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	GGG CAC AGC TGA GCA GAC GGA TGC AGC CGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	GGG CAC AGC TGA GCA GAC GGA TGC AGC CGC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	ACA GGC CTT CCT CGT CTT CGA TCA GCA CCC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	ACA GGC CTT CCT CGT CTT CGA TCA GCA CCC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	ACA GGC CTT CCT CGT CTT CGA TCA GCA CCC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	ACA GGC CTT CCT CGT CTT CGA TCA GCA CCC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	AGT GGG TAT CAG GGG TAT CGA AAC TGT CCT
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	AGT GGG TAT CAG GGG TAT CGA AAC TGT CCT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	AGT GGG TAT CAG GGG TAT CGA AAC TGT CCT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	AGT GGG TAT CAG GGG TAT CGA AAC TGT CCT
#A._hydrophila_029_ahyI_F	GCT CCA GAC CAC GGT GGG ATT CCA CAT CCC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	GCT CCA GAC CAC GGT GGG ATT CCA CAT CCC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	GCT CCA GAC CAC GGT GGG ATT CCA CAT CCC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	GCT CCA GAC CAC GGT GGG ATT CCA CAT CCC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	AGC CGA GGC GAT CGG AGA AGA CGC GAT TGC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	AGC CGA GGC GAT CGG AGA AGA CGC GAT TGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	AGC CGA GGC GAT CGG AGA AGA CGC GAT TGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	AGC CGA GGC GAT CGG AGA AGA CGC GAT TGC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	GAA AGC GAT AAA GCT CGT TTT CTA CCT CCC
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	GAA AGC GAT AAA GCT CGT TTT CTA CCT CCC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	GAA AGC GAT AAA GCT CGT TTT CTA CCT CCC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	GAA AGC GAT AAA GCT CGT TTT CTA CCT CCC
#A._hydrophila_029_ahyI_F	ATC TGG
#A._hydrophila_029-08_ahyI_F	AT - TGG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_F	AT - TGG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_F	AT - TGG

*

Figura 15 – Alinhamento entre sequências do gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e estirpes mutantes utilizando primer direto.

#A._hydrophila_029_ahyI_R	GCT TCG CAA TCG CGT CTT CTC CGA TCG CCT
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	GCT TCG C - A TCG CGT CTT CTC CGA TCG CCT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	GCT TCG C - A TCG CGT CTT CTC CGA TCG CCT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	GCT TCG C - A TCG CGT CTT CTC CGA TCG CCT
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CGG CTG GGA TGT GGA ATC CCA CCG TGG TCT
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CGG CTG GGA TGT GGA ATC CCA CCG TGG TCT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CGG CTG GGA TGT GGA ATC CCA CCG TGG TCT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CGG CTG GGA TGT GGA ATC CCA CCG TGG TCT

*

Continuação da figura 16

#A._hydrophila_029_ahyI_R	GGA GCA GGA CAG TTT CGA TAC CCC TGA TAC
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	GGA GCA GGA CAG TTT CGA TAC CCC TGA TAC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	GGA GCA GGA CAG TTT CGA TAC CCC TGA TAC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	GGA GCA GGA CAG TTT CGA TAC CCC TGA TAC
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CCA CTG GGT GCT GAT CGA AGA CGA GGA AGG
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CCA CTG GGT GCT GAT CGA AGA CGA GGA AGG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CCA CTG GGT GCT GAT CGA AGA CGA GGA AGG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CCA CTG GGT GCT GAT CGA AGA CGA GGA AGG
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CCT GTG CGG CTG CAT CCG TCT GCT CAG CTG
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CCT GTG CGG CTG CAT CCG TCT GCT CAG CTG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CCT GTG CGG CTG CAT CCG TCT GCT CAG CTG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CCT GTG CGG CTG CAT CCG TCT GCT CAG CTG
#A._hydrophila_029_ahyI_R	TGC CCA GGA TTA CAT GCT GCC CAG CAT CTT
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	TGC CCA GGA TTA CAT GCT GCC CAG CAT CTT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	TGC CCA GGA TTA CAT GCT GCC CAG CAT CTT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	TGC CCA GGA TTA CAT GCT GCC CAG CAT CTT
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CCC CAC CGC CCT CGC CGG TGA AGC CCC GCC
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CCC CAC CGC CCT CGC CGG TGA AGC CCC GCC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CCC CAC CGC CCT CGC CGG TGA AGC CCC GCC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CCC CAC CGC CCT CGC CGG TGA AGC CCC GCC
#A._hydrophila_029_ahyI_R	GCG CAG CAA CGA CGT GTG GGA GCT GAC CCG
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	GCG CAG CAA CGA CGT GTG GGA GCT GAC CCG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	GCG CAG CAA CGA CGT GTG GGA GCT GAC CCG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	GCG CAG CAA CGA CGT GTG GGA GCT GAC CCG
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CCT CGC CAT CGA TGC CGA ACG GGC CCC CCG
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CCT CGC CAT CGA TGC CGA ACG GGC CCC CCG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CCT CGC CAT CGA TGC CGA ACG GGC CCC CCG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CCT CGC CAT CGA TGC CGA ACG GGC CCC CCG
#A._hydrophila_029_ahyI_R	GCT CGG CAA CGG CAT CAG CGA ACT GAC CTG
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	GCT CGG CAA CGG CAT CAG CGA ACT GAC CTG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	GCT CGG CAA CGG CAT CAG CGA ACT GAC CTG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	GCT CGG CAA CGG CAT CAG CGA ACT GAC CTG
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CAT CAT CTT CCG CGA GGT CTA TGC CTT TGC
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CAT CAT CTT CCG CGA GGT CTA TGC CTT TGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CAT CAT CTT CCG CGA GGT CTA TGC CTT TGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CAT CAT CTT CCG CGA GGT CTA TGC CTT TGC
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CAA GGC GCA GGG GAT CCG CGA ACT GGT TGC
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CAA GGC GCA GGG GAT CCG CGA ACT GGT TGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CAA GGC GCA GGG GAT CCG CGA ACT GGT TGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CAA GGC GCA GGG GAT CCG CGA ACT GGT TGC
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CGT GGT CAG CCT GCC GGT AGA GCG GAT CTT
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CGT GGT CAG CCT GCC GGT AGA GCG GAT CTT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CGT GGT CAG CCT GCC GGT AGA GCG GAT CTT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CGT GGT CAG CCT GCC GGT AGA GCG GAT CTT
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CCG CCG TCT CGG CCT GCC CAT CGA GCG GCT
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CCG CCG TCT CGG CCT GCC CAT CGA GCG GCT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CCG CCG TCT CGG CCT GCC CAT CGA GCG GCT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CCG CCG TCT CGG CCT GCC CAT CGA GCG GCT

Continuação da figura 16

#A._hydrophila_029_ahyI_R	CGG TCA CCG CCA GGC GGT GGA TCT GGG CGC
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CGG TCA CCG CCA GGC GGT GGA TCT GGG CGC
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CGG TCA CCG CCA GGC GGT GGA TCT GGG CGC
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CGG TCA CCG CCA GGC GGT GGA TCT GGG CGC
#A._hydrophila_029_ahyI_R	CGT GCG CGG GGT CGG GAT CCG CTT CCA TCT
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	CGT GCG CGG GGT CGG GAT CCG CTT CCA TCT
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	CGT GCG CGG GGT CGG GAT CCG CTT CCA TCT
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	CGT GCG CGG GGT CGG GAT CCG CTT CCA TCT
#A._hydrophila_029_ahyI_R	GGA TGA GCG TTT CGC CCG TGC CGT CGG CCA
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	GGA TGA GCG TTT CGC CCG TGC CGT CGG CCA
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	GGA TGA GCG TTT CGC CCG TGC CGT CGG CCA
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	GGA TGA GCG TTT CGC CCG TGC CGT CGG CCA
#A._hydrophila_029_ahyI_R	GCC CCT GCA GGG TGC CTA TGA CGA GGC GCG
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R	GCC CCT GCA GGG TGC CTA TGA CGA GGC GCG
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R	GCC CCT GCA GGG TGC CTA TGA CGA GGC GCG
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R	GCC CCT GCA GGG TGC CTA TGA CGA GGC GCG
#A._hydrophila_029_ahyI_R CGA	
#A._hydrophila_029-8_ahyI_R CGA	
#A._hydrophila_029-14_ahyI_R CGA	
#A._hydrophila_029-21_ahyI_R CGA	

Figura 16 – Alinhamento entre sequências do gene *ahyI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e estirpes mutantes utilizando primer reverso.

#ahyR_A._hydrophila_029	TTA TTG CAT CAG CTT GGG GAA GTT GGT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029-8	TTA TTG CAT CAG CTT GGG GAA GTT GGT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029-14	TTA TTG CAT CAG CTT GGG GAA GTT GGT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029-21	TTA TTG CAT CAG CTT GGG GAA GTT GGT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029	CAC GAC CTG CTC GAG ATT GGG CAG CAA AAT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CAC GAC CTG CTC GAG ATT GGG CAG CAA AAT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CAC GAC CTG CTC GAG ATT GGG CAG CAA AAT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CAC GAC CTG CTC GAG ATT GGG CAG CAA AAT
#ahyR_A._hydrophila_029	GCC ACT GCT CAC CCC CTT GGC GAT GGC CTG
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GCC ACT GCT CAC CCC CTT GGC GAT GGC CTG
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GCC ACT GCT CAC CCC CTT GGC GAT GGC CTG
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GCC ACT GCT CAC CCC CTT GGC GAT GGC CTG
#ahyR_A._hydrophila_029	GTA GCG ATT CAT CGA CCC CGT TTT ACG GGT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GTA GCG ATT CAT CGA CCC CGT TTT ACG GGT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GTA GCG ATT CAT CGA CCC CGT TTT ACG GGT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GTA GCG ATT CAT CGA CCC CGT TTT ACG GGT
#ahyR_A._hydrophila_029	GAC CTG ATT GAG GTG GTA GTT CAC GGT TCG
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GAC CTG ATT GAG GTG GTA GTT CAC GGT TCG
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GAC CTG ATT GAG GTG GTA GTT CAC GGT TCG
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GAC CTG ATT GAG GTG GTA GTT CAC GGT TCG
#ahyR_A._hydrophila_029	CTC CGT GAT CCC CAG GAT GCA GGC GAT TTC
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CTC CGT GAT CCC CAG GAT GCA GGC GAT TTC
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CTC CGT GAT CCC CAG GAT GCA GGC GAT TTC
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CTC CGT GAT CCC CAG GAT GCA GGC GAT TTC

Continuação da figura 17

#ahyR_A._hydrophila_029	ACC CGA CGT TTT CCC TTC ACT GGC CCA GAA
#ahyR_A._hydrophila_029-8	ACC CGA CGT TTT CCC TTC ACT GGC CCA GAA
#ahyR_A._hydrophila_029-14	ACC CGA CGT TTT CCC TTC ACT GGC CCA GAA
#ahyR_A._hydrophila_029-21	ACC CGA CGT TTT CCC TTC ACT GGC CCA GAA
#ahyR_A._hydrophila_029	CAG GCA TTC GGT CTC CCG GTC AGT CAG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CAG GCA TTC GGT CTC CCG GTC AGT CAG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CAG GCA TTC GGT CTC CCG GTC AGT CAG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CAG GCA TTC GGT CTC CCG GTC AGT CAG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029	CTC CTG AGG GTC ATC TTC CCG CAG ACT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CTC CTG AGG GTC ATC TTC CCG CAG ACT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CTC CTG AGG GTC ATC TTC CCG CAG ACT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CTC CTG AGG GTC ATC TTC CCG CAG ACT GAC
#ahyR_A._hydrophila_029	CCG CAC AAT CCG GAT CGC CGC CTC GAA GAT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CCG CAC AAT CCG GAT CGC CGC CTC GAA GAT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CCG CAC AAT CCG GAT CGC CGC CTC GAA GAT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CCG CAC AAT CCG GAT CGC CGC CTC GAA GAT
#ahyR_A._hydrophila_029	GTA GTT GGA CAT CCA GGA GAG GAT GGG CGA
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GTA GTT GGA CAT CCA GGA GAG GAT GGG CGA
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GTA GTT GGA CAT CCA GGA GAG GAT GGG CGA
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GTA GTT GGA CAT CCA GGA GAG GAT GGG CGA
*	
#ahyR_A._hydrophila_029	GGA CTC CAG CAG CAG ATC GCT CGA TGC CCG
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GGA CTC CAG CAG CAG ATC GCT CGA TGC CCG
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GGA CTC CAG CAG CAG ACC GCT CGA TGC CCG
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GGA CTC CAG CAG CAG ATC GCT CGA TGC CCG
#ahyR_A._hydrophila_029	CTC GGC GGT GAT GAA CGA CAG TAT GCC GTT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CTC GGC GGT GAT GAA CGA CAG TAT GCC GTT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CTC GGC GGT GAT GAA CGA CAG TAT GCC GTT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CTC GGC GGT GAT GAA CGA CAG TAT GCC GTT
#ahyR_A._hydrophila_029	CTC CCC TGC CGC ACC GTG CAA CGG GAA CGA
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CTC CCC TGC CGC ACC GTG CAA CGG GAA CGA
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CTC CCC TGC CGC ACC GTG CAA CGG GAA CGA
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CTC CCC TGC CGC ACC GTG CAA CGG GAA CGA
#ahyR_A._hydrophila_029	AAT TCC GTT GCG CAG CCC GAA CTC CGC CGC
#ahyR_A._hydrophila_029-8	AAT TCC GTT GCG CAG CCC GAA CTC CGC CGC
#ahyR_A._hydrophila_029-14	AAT TCC GTT GCG CAG CCC GAA CTC CGC CGC
#ahyR_A._hydrophila_029-21	AAT TCC GTT GCG CAG CCC GAA CTC CGC CGC
#ahyR_A._hydrophila_029	CAA CCC CAT CAC GTC AAG ACT GCC CTC TTG
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CAA CCC CAT CAC GTC AAG ACT GCC CTC TTG
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CAA CCC CAT CAC GTC AAG ACT GCC CTC TTG
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CAA CCC CGT CAC GTC AAG ACT GCC CTC TTG
#ahyR_A._hydrophila_029	CAG AAA ACG CGC CCG CTC ATC CAG CCG GTT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CAG AAA ACG CGC CCG CTC ATC CAG CCG GTT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CAG AAA ACG CGC CCG CTC ATC CAG CCG GTT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CAG AAA ACG CGC CCG CTC ATC CAG CCG GTT

Continuação da figura 17

#ahyR_A._hydrophila_029	CCA GTA AAT GGG CAA GGT CTG CTT GCG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CCA GTA AAT GGG CAA GGT CTG CTT GCG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CCA GTA AAT GGG CAA GGT CTG CTT GCG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CCA GTA AAT GGG CAA GGT CTG CTT GCG GGC
#ahyR_A._hydrophila_029	CAA TTG AAT GAT GGG ATC ACA GGC CAG CAT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CAA TTG AAT GAT GGG ATC ACA GGC CAG CAT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CAA TTG AAT GAT GGG ATC ACA GGC CAG CAT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CAA TTG AAT GAT GGG ATC ACA GGC CAG CAT
#ahyR_A._hydrophila_029	ATG GTT GGC CGT GTA GGC CTG CAC CCA GGA
#ahyR_A._hydrophila_029-8	ATG GTT GGC CGT GTA GGC CTG CAC CCA GGA
#ahyR_A._hydrophila_029-14	ATG GTT GGC CGT GTA GGC CTG CAC CCA GGA
#ahyR_A._hydrophila_029-21	ATG GTT GGC CGT GTA GGC CTG CAC CCA GGA
* *	
#ahyR_A._hydrophila_029	GTC TGG GCA CTG GTT GAA CAG CAC CAC CTT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GTC TGG GCA CTG GTT GAA CAG CAC CAC CTT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GTC TGG GCA CTG GTT GAA AGG CAC CAC CTT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GTC TGG GCA CTG GTT GAA CAG CAC CAC CTT
#ahyR_A._hydrophila_029	GGG TCT TTG CAT CGA CAT GGG AAT GAT CAG
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GGG TCT TTG CAT CGA CAT GGG AAT GAT CAG
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GGG TCT TTG CAT CGA CAT GGG AAT GAT CAG
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GGG TCT TTG CAT CGA CAT GGG AAT GAT CAG
#ahyR_A._hydrophila_029	CGC AAA CCG GTA GTA GTC GTA ACC CAT ACC
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CGC AAA CCG GTA GTA GTC GTA ACC CAT ACC
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CGC AAA CCG GTA GTA GTC GTA ACC CAT ACC
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CGC AAA CCG GTA GTA GTC GTA ACC CAT ACC
#ahyR_A._hydrophila_029	GAG CGT GAA CCG ACC GAT CAA CTC GGC CAA
#ahyR_A._hydrophila_029-8	GAG CGT GAA CCG ACC GAT CAA CTC GGC CAA
#ahyR_A._hydrophila_029-14	GAG CGT GAA CCG ACC GAT CAA CTC GGC CAA
#ahyR_A._hydrophila_029-21	GAG CGT GAA CCG ACC GAT CAA CTC GGC CAA
#ahyR_A._hydrophila_029	ACG ATC CCC GTC CGT TAC CGA AGT GAA ATG
#ahyR_A._hydrophila_029-8	ACG ATC CCC GTC CGT TAC CGA AGT GAA ATG
#ahyR_A._hydrophila_029-14	ACG ATC CCC GTC CGT TAC CGA AGT GAA ATG
#ahyR_A._hydrophila_029-21	ACG ATC CCC GTC CGT TAC CGA AGT GAA ATG
#ahyR_A._hydrophila_029	TTC GAG GTA CTC AAG CAG TTG GTC TTG TTT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	TTC GAG GTA CTC AAG CAG TTG GTC TTG TTT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	TTC GAG GTA CTC AAG CAG TTG GTC TTG TTT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	TTC GAG GTA CTC AAG CAG TTG GTC TTG TTT
#ahyR_A._hydrophila_029	CAT
#ahyR_A._hydrophila_029-8	CAT
#ahyR_A._hydrophila_029-14	CAT
#ahyR_A._hydrophila_029-21	CAT

Figura 17 – Alinhamento entre sequências do gene *ahyR* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e estirpes mutantes utilizando primer direto.

```

**
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_ATCC_7966 ATG CTA GCC CCC CTG GCC AGG G - - CCT CGA
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-8 ATG CTA GCC CCC CTG GCC AGG GGC CTT CGA
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-14 ATG CTA GCC CCC CTG GCC AGG G - - CCT CGA
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-21 ATG CTA GCC CCC CTG GCC AGG G - - CCT CGA

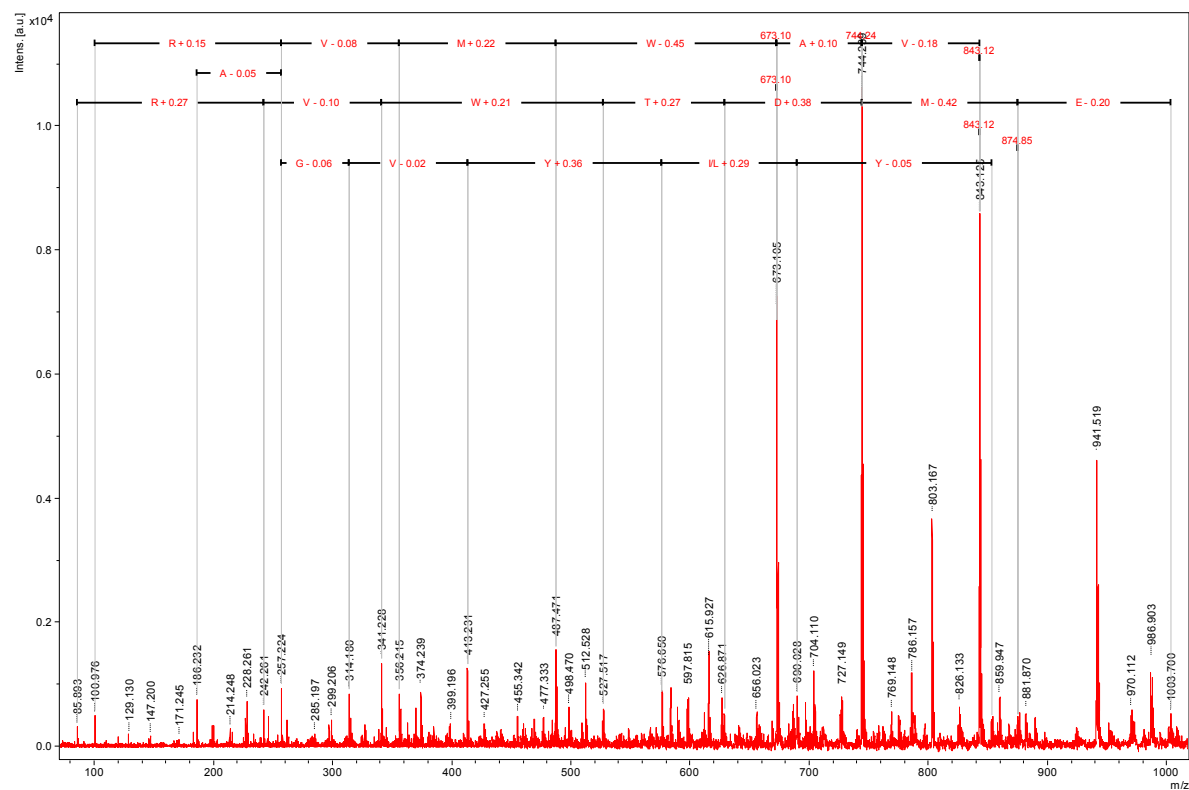
* * * *
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_ATCC_7966 TTA TAG - CG C - C GAA CAC TGA AA - TGG AGA
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-8 TTA AAG GCG CCG GAA CAC TGA AAA TGG AGA
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-14 TTA TAG - CG C - G AAA CAC TGA AAA TGG AGA
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-21 TTA TAG - CG C - C GAA CAC TGA AA - TGG AGA

* *
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_ATCC_7966 CAT CTG A
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-8 CAT CT - -
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-14 CAT CTG A
#Promotor_ahyRI_-_A._hydrophila_029-21 CAT CTG A

```

Figura 18 – Alinhamento entre sequências promotoras dos gene *ahyRI* de *A. hydrophila* Embrapa 029 e estirpes mutantes.

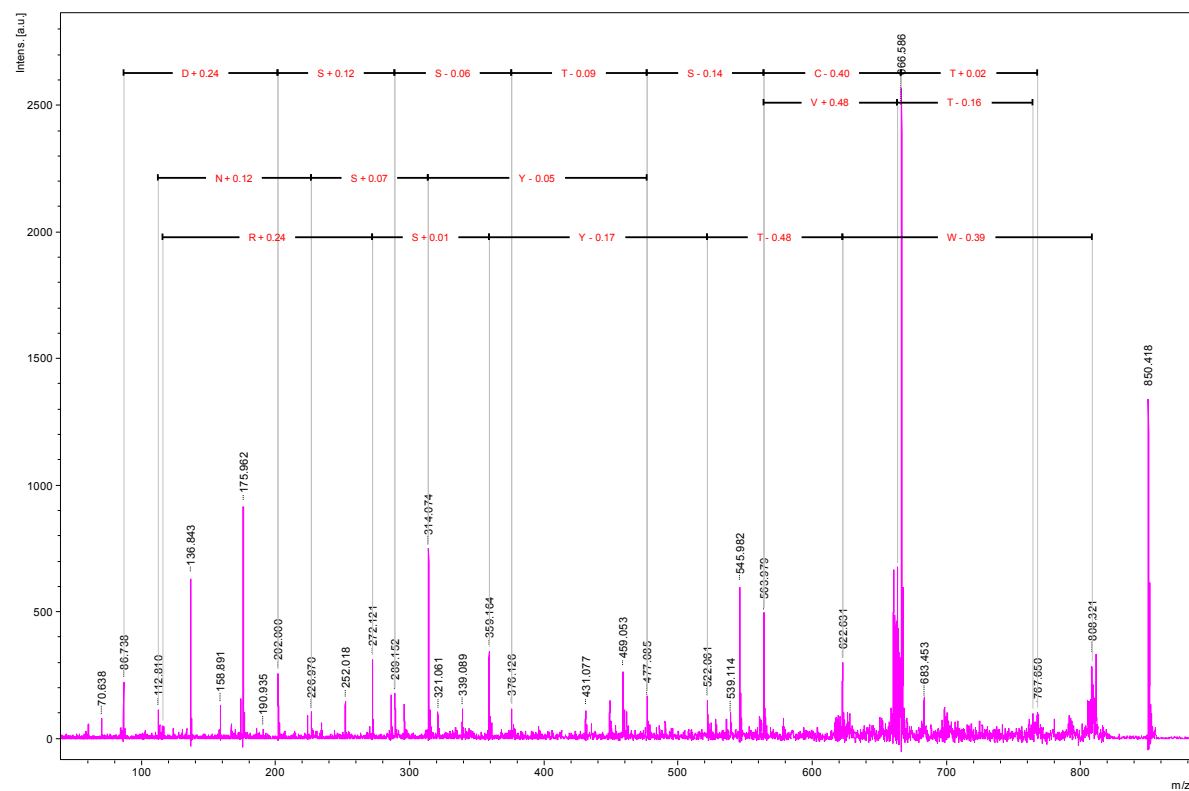
2256.1218



Start Mass	Sequence
186.232	AGVYI/LY
186.232	AVMWAME
100.976	RGVYI/LY
100.976	RVMWAME
85.893	RVWTDME
186.232	AVMWAV
257.224	GVYI/LY
100.976	RVMWAV
85.89	RVWTDV

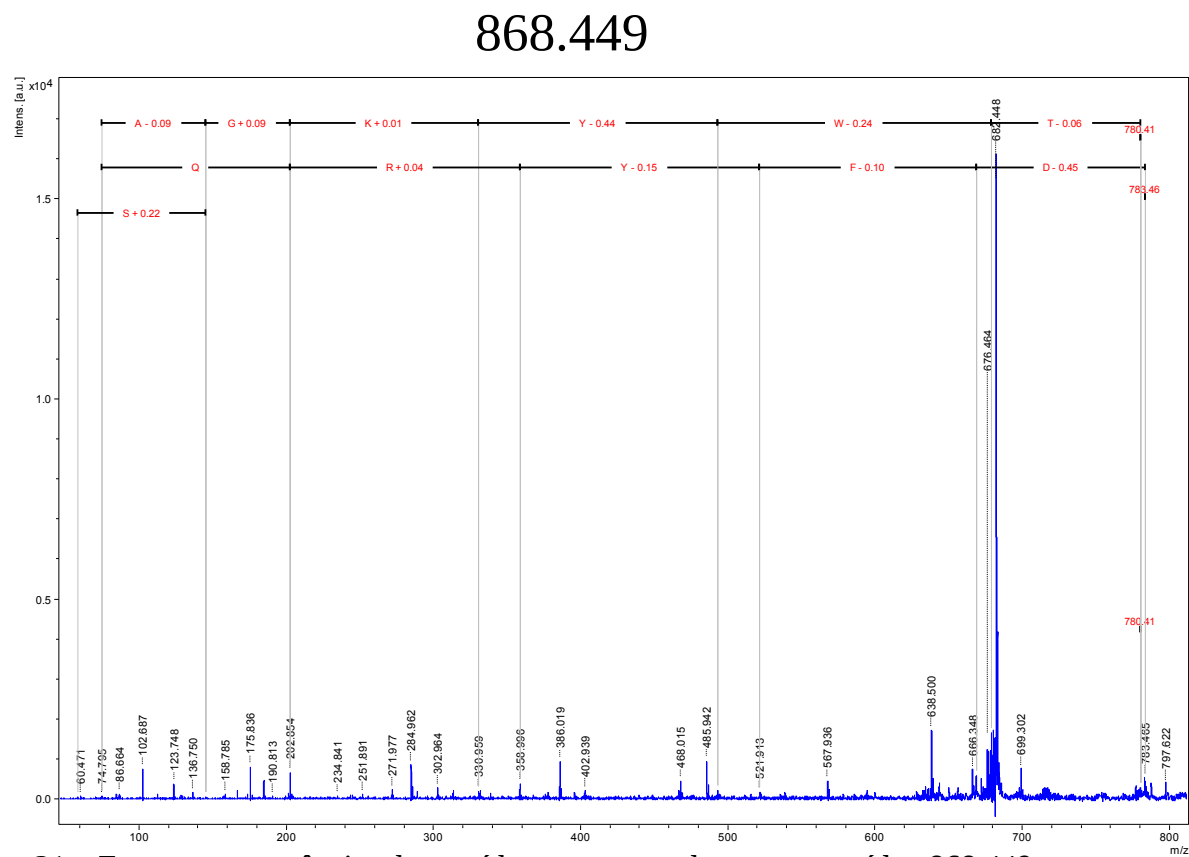
Figura 19 – Espectro e sequências de peptídeos correspondentes ao peptídeo 2256.1218.

850.4838



Start Mass	Sequence
86.738	D S S T S C T
86.738	D S S T S V T
112.810	N S Y S C T
112.810	N S Y S V T
15.784	R S Y T W
563.979	V T

Figura 20 – Espectro e sequências de peptídeos correspondentes ao peptídeo 850.4838.



Start Mass	Sequence
74.795	AGKYWT
74.795	AGRYFD
58.491	SGKYWT
58.491	SGRYFD
74.795	QKYWT
74.795	QRYFD

Figura 21 – Espectro e sequências de peptídeos correspondentes ao peptídeo 868.449.