ADRIANA DOS REIS PONCE

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS CONTROLADAS PELO SISTEMA *QUORUM SENSING* EM *Enterobacter cloacae*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

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

T
P792c
2007

Ponce, Adriana dos Reis, 1982-
Características fenotípicas controladas pelo sistema *quorum sensing* em *Enterobacter cloacae* /Adriana dos Reis Ponce. – Viçosa, MG, 2007.
xii, 57f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 49-57.

1. Comunicação celular. 2.Bactérias gram-negativas - Crescimento. 3. Enzimas proteolíticas. 4. *Enterobacter cloacae*. 5. Alimentos - Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa.II.Título.

CDD 22.ed. 571.6

ADRIANA DOS REIS PONCE

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS CONTROLADAS PELO SISTEMA *QUORUM SENSING* EM *Enterobacter cloacae*

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

APROVADA: 15 de Agosto de 2007

Prof ª. Elza Fernandes de Araújo (Co- orientadora)	Míriam Teresinha dos Santos
Profª Denise Mara Soares Bazzolli	Prof. Maurilio Lopes Martins

Profª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Aos meus amados pais e irmã pelo amor, dedicação, compreensão, apoio incondicional e total incentivo.

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.

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

À minha família que foi 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 por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós Antonio, Dirce e Jurandir que sempre estiveram presentes apesar da distância.

Aos demais familiares, em especial a tia Denise e tia Alessandra pelo apoio e 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 Elza Fernandes de Araújo pelo aconselhamento e sugestões.

Aos professores Maurílio Lopes Martins, Miriam Teresinha dos Santos e Denise Mara Soares Bazzolli por participarem da banca e pelas críticas e sugestões.

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

À professora Silvia das Graças Pompolo por permitir a utilização do microscópio de epifluorescência.

Ao Maurilio Lopes Martins por todos os conselhos, dicas, atenção, apoio e disponibilidade em ajudar, muito importantes para a condução do trabalho e pela amizade.

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

Aos funcionários, Sr. Paulo, Pablo, Sr. Cesário e José Carlos pela disponibilidade em ajudar. Ao Evandro pela ajuda com o liofilizador.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Anaeróbios: Adriana, Aline, Ana Andréa, Ana Diolina, Andréa, Bete, Carla, Carol, Carolina Fernandes, Daniel, Eduardo, Eliane, Eliseth, Emilene, Esther, Evandro, Fernanda, Flávia, Janaína, Marcelão, Marcelo, Marília, Maurilio, Michele, Renata, Rodrigo, Selma, Simone Paes, Simone Quintão, Solimar, Uelinton e Wanessa pela maravilhosa convivência e pelo carinho.

A Eliseth pelas dicas, disponibilidade em ajudar, apoio e principalmente pela amizade.

À querida amiga Adriana, pela grande amizade, paciência e ajuda em todos os momentos, seja no laboratório ou na vida pessoal.

A Emilene pela ajuda, discussão dos experimentos e especialmente pela amizade.

Ao meu grande amigo Thiago pelo carinho, incentivo, apoio, ombro amigo, por estar sempre disposto a ajudar e por tudo que fez e faz por mim.

Ao Eduardo pela disponibilidade e pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Industrial e Fisiologia de Microrganismos, por me cederem espaço para realização de parte de meus experimentos e pela convivência agradável.

A todos os amigos da graduação e do mestrado.

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.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES viii
RESUMO ix
ABSTRACT xi
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1. Mecanismo de comunicação célula-célula 3
2.2. Fenótipos regulados pelo sistema *quorum sensing* 5
2.3. Sistema *quorum sensing* em bactérias isoladas de alimentos 7
2.4. Mecanismos de inibição do sistema *quorum sensing* 9
2.5. Aplicações biotecnológicas do bloqueio do sistema *quorum sensing* 14
3. MATERIAL E MÉTODOS 15
3.1. Bactérias utilizadas 15
3.2. Avaliação da produção de AHLs 16
3.3. Determinação de temperaturas de crescimento 17
3.4. Determinação de crescimento em diferentes meios de cultivo 18
3.5. Determinação de motilidade por espalhamento e por contração 18
3.6. Determinação de formação de biofilme em placas de poliestireno 19
3.7. Determinação da formação de biofilme em cupons de aço inoxidável 19
3.7.1. Quantificação de células aderidas 20
3.7.2. Observação de biofilmes por microscopia de epifluorescência 21
3.8. Avaliação das atividades amilolítica, celulolítica e pectinolítica 21
3.9. Avaliação da atividade lipolítica 21
3.10. Avaliação e quantificação da atividade proteolítica 22

3.11. Grau de proteólise 22
3.12. Zimograma 23
3.13. Avaliação da atividade proteolítica por coagulação do leite 24
3.14. Avaliação do perfil proteínas extracelulares de *E. cloacae* selvagem e tranconjugante 24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
4.1. Produção de AHL pelas estirpes de *E. cloacae* 067 26
4.2. Crescimento *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante em diferentes temperaturas 27
4.3. Crescimento das estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 em diferentes meios 29
4.4. Motilidade 31
4.5. Formação de biofilmes em placas de poliestireno 32
4.6. Formação de biofilme em cupons de aço inoxidável 36
4.7. Atividades amilolítica, celulolítica, pectinolítica e lipolítica 40
4.8. Atividade proteolítica 40
4.9. Quantificação da atividade proteolítica e grau de proteólise 42
4.10. Zimograma 43
4.11. Avaliação da atividade proteolítica por coagulação do leite 45
4.12. Perfil de proteínas extracelulares de *E. cloacae* selvagem e transconjugante 46
5. CONCLUSÕES 48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABC – Meio Mínimo AB contendo citrato como fonte de carbono

ABG – Meio Mínimo AB contendo glicose como fonte de carbono

AHL – Homoserina lactona acilada

AI – autoindutor

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

C4-AHL - N-butanoil-L-homoserina lactona

C6-AHL - N-hexanoil-L-homoserina lactona

DKP – Dicetopiperazina

HHL - N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-AHL)

LB – Meio Luria Bertani

LDR 12% - Leite desnatado reconstituído a 12%

MMS – Meio mínimo de sais

3-oxo-C6-AHL – N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona

3-oxo-C8-AHL - N-3-oxooctanoil-L-homoserina lactona

PQS – 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona

TYEP – Meio triptona, extrato de levedura e fosfato

RESUMO

PONCE, Adriana dos Reis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Características fenotípicas de *Enterobacter cloacae* controladas pelo sistema *quorum sensing*** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Hilário Cuquetto Mantovani.

Muitas bactérias apresentam um sistema elaborado de comunicação entre células dependente de densidade celular, denominado como *quorum sensing*, e o conhecimento de fenótipos controlados por esse mecanismo pode contribuir para a elucidação de processos importantes na microbiologia de alimentos. O objetivo deste trabalho foi determinar fenótipos regulados por *quorum sensing* em *Enterobacter cloacae* 067, isolado de leite cru refrigerado. Foram comparadas características fenotípicas da estirpe selvagem de *E. cloacae* 067 com uma estirpe transconjugante, que sintetiza a enzima lactonase, responsável pela hidrólise de acil homoserina lactonas (AHLs), moléculas sinal do sistema *quorum sensing*. Estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 cresceram em temperaturas de 4 °C a 43 °C, com ótimo entre 36 °C e 43 °C e a população máxima foi atingida a 30 °C. A densidade óptica das culturas da estirpe transconjugante foram maiores ($p < 0,05$) do que a da selvagem, tanto em meios de cultura complexos como em meios minerais, contendo uma única fonte de carbono orgânico. A motilidade por espalhamento não foi verificada nas estirpes testadas e a motilidade por contração não foi alterada no transconjugante. Biofilmes foram formados

em superfície de poliestireno e a estirpe *E. cloacae* 067 selvagem apresentou maior adesão que a estirpe transconjugante, quando cultivada nos meios Luria Bertani (LB), triptona, extrato de levedura e fosfato (TYEP) e meio mínimo de sais (MMS). A adição de cálcio ao meio TYEP reduziu a formação de biofilmes pela estirpe selvagem, mas não na transconjugante. Em superfície de aço inoxidável a adesão da estirpe selvagem foi cerca de um ciclo logarítmico maior do que a transconjugante, por até 48 horas de incubação. Após este período, diferenças entre as estirpes não foram detectadas, tanto na observação microscópica quanto na contagem de células viáveis aderidas. A diferença na adesão de *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante em poliestireno e em aço inoxidável sugere que o sistema *quorum sensing* regula a formação de biofilmes nesta estirpe. Atividades das enzimas amilases, celulases, lipases e pectinases não foram verificadas nas estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067. Entretanto, o transconjugante foi capaz de liquefazer a gelatina após 12 dias de incubação a 30 °C, o que não foi observado na estirpe selvagem. O transconjugante de *E. cloacae* 067 também apresentou maior atividade proteolítica em ágar caseinato e em ágar LB acrescido de 2 % de leite e maior grau de proteólise do leite do que o selvagem. A coagulação do leite desnatado reconstituído a 12 % e do leite pasteurizado por *E. cloacae* 067 transconjugante ocorreu após 36 horas de incubação, enquanto a estirpe selvagem coagulou o leite somente após 96 horas. Estes resultados sugerem a existência de um mecanismo de regulação negativa da atividade proteolítica em *E. cloacae* 067 pelo sistema *quorum sensing*. A atividade proteolítica de ambas as estirpes avaliadas não foi detectada em zimograma contendo azocaseína como substrato. Entretanto, quando gelatina foi usada como substrato, foi possível a observação de atividade proteolítica no extrato proteico das estirpes selvagem e transconjugante no gel. A análise dos sobrenadantes livres de células e concentrados 15 vezes, em gel de poliacrilamida evidenciou maior número de bandas de proteínas extracelulares produzidas pela *E. cloacae* 067 selvagem do que pela transconjugante, sugerindo que o sistema *quorum sensing* pode estar envolvido na regulação de outras proteínas extracelulares, além de proteases.

ABSTRACT

PONCE, Adriana dos Reis, M.S., Universidade Federal de Viçosa, august 2007. **Phenotypics characteristics by *Enterobacter cloacae* controlled for the system *quorum sensing*.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo and Hilário Cuquetto Mantovani.

Many bacteria present an elaborate system of communication dependent of cell density known as quorum sensing, and the knowledge of the phenotypes controlled by this mechanism may contribute for the elucidation of important processes in food microbiology. The objective of this study was to determine phenotypes regulated by quorum sensing in *Enterobacter cloacae* 067 isolated from cooled raw milk. Phenotypic characteristics of *E. cloacae* 067 wild type were compared to the transconjugant strain, that synthesizes the lactonase enzyme, which is responsible for hydrolysis of N-acylhomoserine lactones (AHLs) that are signal molecules of the quorum sensing system. Wild type and transconjugant strains of *E. cloacae* 067 were grown in temperatures from 4 °C until 43 °C. The optimum temperature was between 36 °C and 43 °C and the maximum population was reached at 30 °C. The optical density of transconjugant strain culture was higher ($p < 0,05$) than the wild type in both complex and in mineral medium which contained only one organic carbon source. The swarming motility was not verified in *E. cloacae* strains tested and the twitching motility was not modified in the transconjugant. Biofilms was formed in polystyrene surface and *E. cloacae* 067 wild type presented higher adhesion than the transconjugant strain when cultivated in Luria Bertani medium (LB), triptona, extract yeast and phosphate medium

(TYEP), and in minimal medium (MMS). The addition of calcium to the TYEP medium reduced the biofilm formation by the wild type, but not in the transconjugant. In stainless steel surface, the adhesion of the wild type was approximately one logarithmic cycle higher than the transconjugant until 48 hours of incubation. After this period, differences were not detected in both microscopic observation and in the counting of adhered viable cells. The difference in adhesion of *E. cloacae* 067 wild type and transconjugant in polystyrene and stainless steel suggests that quorum sensing system regulates biofilm formation by this strain. Amylases, celulases, lipases and pectinases activities were not verified in the wild type and transconjugant strains of *E. cloacae* 067. However, the transconjugant strain was capable to use gelatin after 12 days of incubation at 30 °C. The transconjugant of *E. cloacae* 067 presented higher proteolytic activity in casein agar and in LB agar added of 2% (w/v) of skim milk. This strain also presented higher degree of proteolyses than the wild type. The spoilage of reconstituted 12% (w/v) skim milk and of pasteurized milk for *E. cloacae* 067 transconjugant occurred after 36 hours of incubation, while the milk spoilage for the wild type strain occurred only after 96 hours. These results suggest the existence of a mechanism of partial negative regulation of proteolytic activity in *E. cloacae* 067 for the quorum sensing system. The proteolytic activity of both strains was not detected in the zimogram azocasein gel. However, when gelatin was used as substrate, it was possible to observe proteolytic activity in protein extract of the wild type and transconjugant strains. Analysis of the free supernatant of cells, concentrated 15 turn, in SDS-PAGE exhibited higher number of extracellular protein bands produced by *E. cloacae* 067 wild type than the transconjugant. Therefore, this suggests that besides proteases, quorum sensing system may be involved in the regulation of other extracellular proteins.

1. INTRODUÇÃO

Muitas bactérias apresentam um sistema elaborado de comunicação entre células dependente de densidade celular, conhecido como *quorum sensing*. Nesse processo, a bactéria é capaz de monitorar a presença de outras ao seu redor pela produção e resposta a moléculas sinalizadoras ou autoindutoras. O *quorum sensing* regula uma série de características fenotípicas, incluindo a produção de antibióticos, formação de biofilme, bioluminescência, diferenciação celular, competência, crescimento, produção de pigmentos, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, esporulação, motilidade, produção de toxinas e expressão de genes de virulência.

Acredita-se que o *quorum sensing* tenha função importante na deterioração de alimentos, pois diferentes gêneros de bactérias, incluindo muitos membros da família *Enterobacteriaceae*, isoladas de alimentos, como produtos cárneos e leite, foram identificados como produtores de moléculas sinalizadoras. Entretanto, ainda são poucas as informações a respeito da função dessas moléculas na ecologia microbiana dos alimentos.

Um grupo importante de deterioradores de alimentos é o de bactérias psicrotróficas, que constituem a microbiota predominante em muitos alimentos conservados em temperaturas de refrigeração. Em leite cru refrigerado, as bactérias psicrotróficas produtoras de enzimas proteolíticas e lipolíticas são as principais causadoras de alterações que comprometem a qualidade e o rendimento de produtos lácteos. Muitas bactérias psicrotróficas são também capazes de formar biofilmes em

diversas superfícies de contato com alimentos, como equipamentos, latões, tanques de resfriamento e tubulações e representam um risco elevado de contaminação antes e após o processamento, podendo resultar na deterioração do alimento ou torná-lo veículo de microrganismos patogênicos.

Entre as bactérias psicrotróficas, frequentemente isoladas de leite cru refrigerado, encontram-se representantes da família *Enterobacteriaceae*, como *Enterobacter*, *Hafnia* e *Serratia*. Espécies de *Enterobacter* são amplamente distribuídas em humanos e animais, assim como na água, solo e alimentos. Embora reconhecidas como produtoras de AHLs, ainda não se sabe quais os fenótipos são controlados por *quorum sensing* nesse gênero.

Para o estudo e compreensão do mecanismo de *quorum sensing* e dos fenótipos por ele regulados, geralmente, são utilizadas estratégias que incluem a inibição da biossíntese da molécula sinal, a aplicação de antagonistas ou agonistas, a inativação química, a inativação enzimática ou a biodegradação de moléculas sinalizadoras.

Considerando a importância de se contribuir para a elucidação de processos como crescimento bacteriano, deterioração de alimentos e formação de biofilmes, este estudo teve como objetivo, avaliar fenótipos controlados por *quorum sensing* em isolado de *Enterobacter cloacae* proveniente de leite cru refrigerado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mecanismo de comunicação célula-célula

Por um longo tempo acreditava-se que as bactérias existiam como células individuais que buscavam por nutrientes e se multiplicavam, sendo estudadas como populações de células que agiam de forma independente. Mais recentemente, tem se tornado claro que muitas bactérias são capazes de perceberem informações que se originam de animais, de plantas hospedeiras e de outras bactérias (FUQUA *et al*., 1996), indicando que existe 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 em seu ambiente. Um grupo particular de metabólitos secundários tem sido caracterizado pela sua importância na regulação da expressão de genes dependentes da densidade celular (KELLER e SURETTE, 2006) e este comportamento tem sido referido, coletivamente, como *quorum sensing* ou comunicação célula-célula (FUQUA *et al*., 1996).

O sistema de sinalização dependente de densidade celular, *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 microrganismo 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 microrganismo, organizar uma resposta unificada favorável a 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 microrganismos 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).

São reconhecidos dois tipos de sistemas *quorum sensing*: intraespécie e interespécies (MARCH e BENTLEY, 2004). A comunicação intraespécie em bactérias Gram-negativas é frequentemente mediada por *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). Em Gram-positivas, a comunicação intraespécies é facilitada por peptídeos (MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al*., 2001). A comunicação intra e interespécies utiliza moléculas de furanosil borato diéster (AI-2) e uma molécula diéster não boratada (vAI-2) (LAZAZZERA, 2001; SPERANDIO *et al*., 2003). O autoindutor 3 (AI-3) está envolvido na comunicação cruzada entre *Escherichia coli* O157:H7 e a epinefrina do sistema sinalizador da célula do hospedeiro (SPERANDIO *et al*., 2003). 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), as 2-heptil-3hidroxil-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 o ácido 3 – hidroximetil éster palmítico (3OH PAME) (FLAVIER *et al*., 1997).

Ainda não está completamente elucidada como a comunicação celular ocorre nas bactérias. Pesquisas sobre a sinalização baseada em *N*-acil-homoserinas lactonas mostram que esse sistema é muito comum. Entretanto, os tipos de moléculas potenciais

que as bactérias produzem e às quais respondem para se adaptarem ao ambiente, incluindo ambientes competitivos, ainda são pouco exploradas, mas é crescente o número de moléculas sinalizadoras identificadas (KELLER e SURETTE, 2006).

2.2. Fenótipos regulados pelo sistema *quorum sensing*

Muitos estudos demonstraram que o *quorum sensing* regula uma série de fenótipos, incluindo a produção de antibióticos, formação de biofilmes, bioluminescência, diferenciação celular, competência, crescimento, produção de pigmentos, 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).

A formação de biofilmes é dependente de *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa* (DAVIES *et al*., 1998), *Aeromonas hydrophila* (LYNCH *et al*., 2002) e *Burkholderia cepacia* (HUBER *et al*., 2001; RIEDEL *et al*., 2003). Nestas espécies foi comprovada que, a formação de microcolônias não é dependente do sistema *quorum sensing* mas a diferenciação das microcolônias para formar o biofilme maduro é dependente da comunicação entre as células (PARSEK e GREENBERG, 2000, HUBER *et al*., 2001; LYNCH *et al*., 2002).

Em muitas bactérias, a síntese de certos antibióticos é controlada por *quorum sensing*, como a produção de carbapenemo em *Serratia* e *Erwinia* (SMITH *et al*., 2004) e de mupirocina e fenazina em *Pseudomonas fluorescens* (EL SAYED *et al*., 2001; KHAN *et al*., 2005). Em *P. fluorescens* foram identificados dois possíveis genes regulatórios da biossíntese de mupirocina, *mupR* e *mupI*, cuja seqüência predita dos aminoácidos codificados mostra identidade significante com proteínas envolvidas no sistema regulatório de *quorum sensing* tais como LasR/LuxR e LasI/LuxI. A inativação, por deleção, desses genes confirmou o requerimento de ambos para a biossíntese desse antibiótico (EL SAYED *et al*., 2001). O operon *phz*, que é requerido para a produção de fenazina, é precedido por dois genes, *phzR e phzI*, que são similares aos genes da família LuxR/LuxI. A deleção de *phzR e phzI* resultou em ausência de produção de fenazina, bem como de AHLs que incluem quatro derivados 3-hidroxil AHL e dois derivados alcanoil-AHL (KHAN *et al*., 2005).

Em *Serratia liquefaciens* foi demonstrado que a diferenciação em células capazes de se moverem por espalhamento (*swarming*), importantes para a rápida colonização de superfícies, envolve o sistema *quorum sensing* (EBERL *et al*., 1996).

Outro fenótipo controlado por *quorum sensing* em algumas bactérias é a produção de enzimas hidrolíticas. Em *Serratia proteamaculans* B5a foi verificado que o sistema *quorum sensing* é responsável pela regulação de enzimas proteolíticas, lipolíticas e quitinolíticas (CHRISTENSEN *et al*., 2003). Análise em zimograma específico para detecção de cada enzima não revelou atividade das enzimas avaliadas nos sobrenadantes livres de células da estirpe mutante de *S. proteamaculans* B5a (AC1), que possui uma mutação no gene *sprI*, que codifica uma sintase de AHL. Entretanto, com a adição de 100 nM de 3-oxo-C6-AHL ao meio de cultivo do mutante *S. proteamaculans* B5a (AC1) foi verificada atividade das enzimas avaliadas. Esses mesmos autores também avaliaram a coagulação do leite inoculado com as estirpes selvagem e mutante de *S. proteamaculans* e verificaram que o leite contendo 1 x 10^6 UFC. mL^{-1} da estirpe mutante não coagulou o leite após 18 horas de incubação a temperatura ambiente. Entretanto, com a adição de 200 nM de 3-oxo-C6-AHL a coagulação do leite foi observada, sugerindo que a coagulação foi causada pela atividade das enzimas proteolíticas e que estas enzimas são reguladas pelo sistema *quorum sensing*.

MARTINS (2007) obteve uma estirpe transconjugante de *Enterobacter cloacae*, por conjugação triparental utilizando como estirpe doadora *E. coli* S17-1 (pBHR1-aiiA-km^r) e estirpe *helper E. coli* HB101 (pRK600). A estirpe transconjugante é portadora do gene *aiiA* de *Bacillus,* que codifica a lactonase responsável pela clivagem do anel lactona da AHLs. Essa estirpe transconjugante não acumula AHL e apresentou maior atividade proteolítica em ágar Luria Bertani acrescido de 2 % de leite e maior potencial de coagulação de leite desnatado reconstituído a 12 % do que a estirpe selvagem. Para MARTINS (2007), houve indicação de um possível controle negativo parcial da atividade proteolítica pelo sistema *quorum sensing* em *E. cloacae*. Entretanto, em zimograma contendo azocaseína como substrato, esse mesmo autor não observou atividade proteolítica no extrato livre de células das estirpes selvagem e transconjugante. No entanto, em duas estirpes de *P. fluorescens*, 041 e 07A, o mecanismo de bloqueio de *quorum sensing* pela clonagem e expressão do gene *aiiA* não

influenciou a atividade proteolítica, sugerindo que, nesses isolados, não há o controle dessa enzima pela ação de AHLs (MARTINS, 2007).

2.3. Sistema *quorum sensing* em bactérias isoladas de alimentos

Pelo fato do mecanismo de comunicação célula-célula ocorrer em diversas espécies microbianas, o *quorum sensing* provavelmente desempenha uma função na ecologia microbiana de alimentos. Acredita-se que o *quorum sensing* tenha participação importante na deterioração de alimentos ou no crescimento e na produção de toxinas por patógenos em alimentos (SMITH *et al*., 2004). Diferentes gêneros de bactérias, incluindo muitos membros da família *Enterobacteriaceae*, contaminantes de peixes (GRAM *et al*., 1999; GRAM *et al*., 2002), frango (GRAM *et al*., 2002), produtos carneos (GRAM *et al*., 1999; BRUHN *et al*., 2004) e leite (LINDBERG *et al*., 1998, PINTO *et al*., 2007) produzem AHLs. Estas moléculas foram detectadas em uma variedade de alimentos em processo de deterioração, tais como broto de feijão (RASCH *et al.*, 2005), salmão defumado a frio (GRAM *et al*., 1999) e carne embalada a vácuo (BRUHN *et al*., 2004).

A deterioração do leite por *S. proteamaculans* foi dependente da presença de AHL e é, portanto, controlada por *quorum sensing* (CHRISTENSEN *et al*., 2003). JAY *et al*. (2003) sugeriram que o sistema *quorum sensing* desempenha uma importante função na deterioração de carne *in natura* mantida sob baixas temperaturas. BRUHN *et al.* (2004) verificaram que *Hafnia alvei* é a bactéria mais comumente identificada como produtora de AHL, isolada de amostras de carne embalada a vácuo, sendo a presença de *N*-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona confirmada em cultura pura dessa bactéria. Os resultados desses autores indicaram que, embora *H. alvei* não esteja diretamente relacionada à deterioração da carne embalada a vácuo, a AHL produzida por ela pode atuar, por comunicação cruzada, sobre outras bactérias deterioradoras que utilizam o sistema *quorum sensing*.

DUNSTALL *et al.* (2005) avaliaram o efeito de nove AHLs sintéticas no crescimento de *P. fluorescens* isoladas de leite e constataram que *N*-benzoiloxicarbonil-L-homoserina lactona e *N*-3-oxihexanoil-DL-homoserina lactona reduziram a duração da fase lag e aumentaram a taxa de crescimento de três estirpes avaliadas. Esses autores

sugeriram mais estudos para elucidar o efeito de AHLs sobre a atividade proteolítica. PINTO (2005) verificou que a adição de AHL sintética ao meio de cultura de *P. fluorescens* não promoveu aumento da atividade proteolítica, sugerindo que o sistema *quorum sensing* não regula a síntese de proteases nessa espécie. Resultados de MARTINS (2007) reforçaram as evidências de que a atividade proteolítica de *P. fluorescens* isolada de leite cru granelizado não depende da presença de AHL.

Muitos gêneros da família *Enterobacteriaceae* como *Enterobacter*, *Yersinia, Erwinia* e *Serratia*, são capazes de produzir AHLs e possuem genes regulados pelo sistema *quorum sensing* (JONES *et al*., 1993; EBERL *et al*., 1996; GRAM *et al*., 1999; CHRISTENSEN *et. al*., 2003; ATKINSON *et al*., 2006)

Os membros da família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos que, quando são capazes de se locomover, normalmente fazem por meio de flagelos peritríquios. Eles possuem necessidades nutricionais simples e são um importante grupo bacteriano. Os gêneros que compõem a família *Enterobacteriacea* são: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia* e *Enterobacter* (TORTORA, 2005).

As espécies de *Enterobacter* são amplamente distribuídas em humanos e animais, assim como na água, no esgoto e no solo (TORTORA, 2005). Duas espécies de *Enterobacter*, *E. cloacae* e *E. aerogenes*, são importantes por causar infecções no trato urinário e infecções hospitalares. Atualmente, a espécie *E. sakazakii* tem recebido destaque importante por ser um patógeno oportunista associado a vários casos de meningites ou enteritites, particularmente em bebês (BARREIRA *et al*., 2003). *E. sakazakii*, *E. cloacae* e *E. agglomerans* são consideradas as principais espécies do gênero frequentemente isoladas de amostras de alimentos (FARMER *et al*., 1980). *E. cloacae* WBMH-3-CM^r transformada com gene *inaA* de *Erwinia* (*Pantoea*) *ananas* IN10, tem potencial para uso em controle biológico de larvas de amora, *G. duplicalis*. *E. cloacae* é importante, pois é capaz de colonizar o intestino de uma ampla variedade de insetos e não causa danos a plantas (WATANABE, ABE e SATO, 2000).

Espécies de *Enterobacter* e outros membros da família *Enterobacteriaceae* são reconhecidos como produtores de AHLs. Dentre eles, *E. agglomerans* e *Serratia liquefaciens* predominaram entre os produtores de AHLs em salmão defumado a frio e incubado a 5 ºC (GRAM *et al*., 1999). *E. agglomerans* produz 3-oxo-C8-AHL e em menor concentração, 3-oxo-C6-AHL, enquanto *S. liquefaciens* sintetiza principalmente 3-oxo-C6-AHL (GRAM *et al*., 1999). Esses autores verificaram que, após a inoculação

de salmão defumado com *E. agglomerans* ou *S. liquefaciens* e subseqüente estocagem a 5 °C sob condições anaeróbias, a contagem bacteriana chegou a, aproximadamente, 10^7 UFC. g^{-1} em 10 dias e a concentração de AHL aumentou, aproximadamente, 200 vezes, o que pode indicar uma relação entre produção de AHL e deterioração do salmão.

A influência da fonte de carbono, temperaturas de 5 °C e 25 °C, concentrações de 0 a 7 % de sal, pH de 6,6 a 8,0 e a co-existência com bactérias do ácido láctico no perfil e taxa de produção de AHLs por *E. agglomerans* B5a e *S. proteamaculans* B5a também foram avaliadas. As duas espécies produziram os mesmos tipos de AHLs sob todas as condições, mas constatou-se perda de atividade de AHL em valores de pH acima de 7,5 (FLODGAARD *et al*., 2003).

A análise por cromatografia em camada fina de extratos livres de células em acetato de etila de 56 linhagens de *E. sakazakii* evidenciou a presença de dois diferentes tipos de AHLs, 3-oxo-C6-AHL e 3-oxo-C8-AHL, indicando que o sistema *quorum sensing* pode estar envolvido na regulação gênica dessa espécie (LEHNER *et al*., 2005).

Esses estudos mostram clara evidência de que muitas bactérias contaminantes de alimentos produzem AHLs. Entretanto, a importância do sistema *quorum sensing* na ecologia microbiana de alimentos, principalmente na deterioração de alimentos, requer mais investigações. Além disso, pouco se sabe a respeito da estabilidade dessas moléculas sinalizadoras à temperatura e se o processamento e condições de estocagem de alimentos podem influenciar a quantidade e a biodisponibilidade das AHLs. Portanto, o entendimento dos mecanismos de comunicação bacteriana pode levar ao desenvolvimento de técnicas de prevenção da deterioração dos alimentos (PILLAI e JESUDHASAN, 2006).

2.4. Mecanismos de inibição do sistema *quorum sensing*

Considerando que uma diversidade de espécies de bactérias utiliza o sistema *quorum sensing* para coordenar suas atividades biológicas, levando a vantagens competitivas como, por exemplo, produção de antibióticos e fatores de virulência é compreensível que competidores possam, também, ter desenvolvido mecanismos para desarmar o sistema *quorum sensing* desses microrganismos e ganhar a competição (DONG e ZHANG, 2005). Inibidores do sistema *quorum sensing*, como enzimas

capazes de hidrolisar a molécula sinal e análogos de molécula sinal foram identificados em organismos procariotos e eucariotos (ZHANG e DONG, 2004). A utilização desses antagonistas e de enzimas que degradam moléculas sinalizadoras é importante, pois, ao inibirem a cascata de transdução de sinal de *quorum sensing*, podem reduzir a expressão de fatores de virulência e o desenvolvimento de biofilmes (SMITH *et al.*, 2004). Esses compostos que inibem o sistema *quorum sensing* constituem uma nova geração de agentes antimicrobianos com aplicações em muitos campos, incluindo medicina humana e veterinária, agricultura, segurança e deterioração de alimentos (PILLAI e JESUDHASAN, 2006).

A primeira técnica de interrupção de *quorum sensing* teve como alvo a inibição da biossíntese da molécula sinal. Em muitos casos, uma proteína similar a LuxI de *Vibrio fischeri* catalisa a biossíntese de AHLs em Gram-negativos, usando a proteína acil carreadora (para formar a cadeia acil) e *S*-adenosilmetionina (para o motivo homoserina lactona) como substratos (FUQUA e GREENBERG, 2002). Como uma alternativa para bloquear a biossíntese de AHL, PARSEK *et al*. (1999) verificaram que análogos de *S*-adenosilmetionina, tal como *S*-adenosilcisteína, podem inibir a atividade da sintase de AHL em *P. aeruginosa*, acima de 97 %. Assim, é possível utilizar análogos de *S*-adenosilmetionina como inibidores específicos de *quorum sensing*, uma vez que, pesquisas em bancos de dados revelaram que nenhuma seqüência na sintase de reconhecimento de AHL está presente em outras enzimas com sítios de ligação para *S*-adenosilmetionina. Portanto, essa estratégia não afeta outros processos vitais em organismos procariotos e eucariotos (PARSEK *et al*. 1999).

Outro mecanismo de interrupção do sistema *quorum sensin*g é a utilização de antagonistas, moléculas que podem se ligar a reguladores de resposta de *quorum sensing*, impedindo a ativação dos mesmos. A alga marinha vermelha *Delisea pulcha* desenvolveu mecanismo de defesa para impedir que sua superfície fosse colonizada por bactérias e produz furanonas halogenadas como antagonistas de AHLs (GIVSKOV *et al*., 1996). Por apresentar estrutura similar a das AHLs, as furanonas halogenadas são capazes de se ligarem a proteína do tipo LuxR e, com isso, inibir a sua ativação pela AHL (RASMUSSEN *et al*., 2000). GIVSKOV *et al*. (1996) verificaram que furanonas halogenadas interferem no sistema *quorum sensing* e afetaram a motilidade de *S. liquefaciens*. O efeito inibitório das furanonas na formação de biofilmes, mas não no crescimento de *H. alvei* 071, também foi constatado por VIANA (2006).

Em alguns casos, as AHLs por si mesmas, atuam como antagonistas de *quorum sensing*. Por exemplo, a estirpe *Chromobacterium violaceum* produz o pigmento violaceína quando a AHL de cadeia curta C6-AHL é produzida. Entretanto, a produção de pigmento é inibida por cadeias de AHL contendo 10 ou mais carbonos (MCCLEAN *et al*., 1997).

As moléculas de AHLs são quimicamente inativadas por oxidação com antimicrobianos halogenados e dependente de pH, produzindo acil-homoserina (DEFOIRDT *et al*., 2004). MICHELS *et al*. (2000) verificaram que, em pH 6,0 a molécula de 3-oxo-AHL reage rapidamente com duas moléculas de ácido hipocloroso, produzindo uma molécula de 2,2-dihalo-3-oxo AHL. Subsequentemente, a cadeia acil é hidrolisada, produzindo ácido graxo e 2,2-dihalo-*N*-etanoil-L-homoserina lactona. Em pH 3, a reação para após a etapa de halogenação, enquanto em pH 8, o anel lactona de 2,2-dihalo-*N*-etanoil-L-homoserina lactona é hidrolisado, produzindo 2,2-dihalo-*N*-etanoil-L-homoserina e, com isso, inativando a AHL.

A capacidade de degradar AHLs parece ser amplamente distribuída entre as bactérias para bloquear o sistema *quorum sensing* de seus competidores e obter, com isso, vantagens seletivas (DEFOIRDT *et al*., 2004). A inativação enzimática das moléculas sinalizadoras pode ser mediada pelas lactonases e acilases (DEFOIRDT *et al*., 2004). Essa inativação enzimática tem sido demonstrada e documentada em, pelo menos, 10 espécies bacterianas (Tabela 1) incluindo espécies de *Bacillus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Rastonia* sp. e *Variovorax paradoxus* (DONG e ZHANG, 2005).

A primeira enzima bloqueadora de *quorum sensing* foi identificada em uma espécie de *Bacillus* isolada do solo e foi mais tarde, caracterizada como lactonase, codificada pelo gene *aiiA* (DONG *et al.*, 2001). O anel lactona pode ser hidrolisado nas posições 1 e 2 por essa enzima (Figura 1A) (DONG e ZHANG, 2005). Estudos revelaram que a enzima AiiA abre o anel lactona produzindo N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina (DONG *et al*., 2001) (Figura 1B). As lactonases codificadas pelo gene *aiiA* de *Bacillus* sp. apresentam alta atividade catalítica e especificidade contra diferentes moléculas de AHLs, e atua melhor em moléculas de AHLs sem a substituição oxo (WANG *et al*., 2004). Embora apresentem uma pequena seqüência de ligação que se assemelha ao motivo de ligação ao zinco, as lactonases não são metaloenzimas, o pH ótimo é próximo a 8,0, não são ativas em pH 5,0 e perdem a estrutura assimétrica em pH 5,0 a 6,0 (WANG *et al*., 2004).

Tabela 1. Espécies de bactérias que apresentam enzimas que degradam AHLs

Espécies	Gene	Referências
Bacillus sp. 240B1	*aiiA*	Dong *et al*., 2000
Bacillus thuringiensis	*aiiA* homólogo	Dong *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002
Bacillus cereus	*aiiA* homólogo	Dong *et al.*, 2002; Reimmanne *et al.*, 2002
Bacillus mucoide	*aiiA* homólogo	Dong *et al.*, 2002
Bacillus anthracis	*aiiA* homólogo	Ulrich, 2004
Agrobacterium tumefaciens	*attM, aiiB*	Zhang *et al*., 2002; Carlier *et al*., 2003
Arthrobacter sp. IBN 110	*ahlD*	Park *et al*., 2003
Klebsiella pneumoniae	*ahlK*	Park *et al*., 2003
Variovorax paradoxus VAI-C	ND*	Leadbetter e Greenberg, 2000
Rastonia XJ12B	*aiiD*	Lin *et al.*, 2003; Hu *et al*., 2003
Pseudomonas aeruginosa PAO1	*pvdQ*	Huang *et al*., 2003

*ND, não identificado
Fonte: DONG e ZHANG, 2005

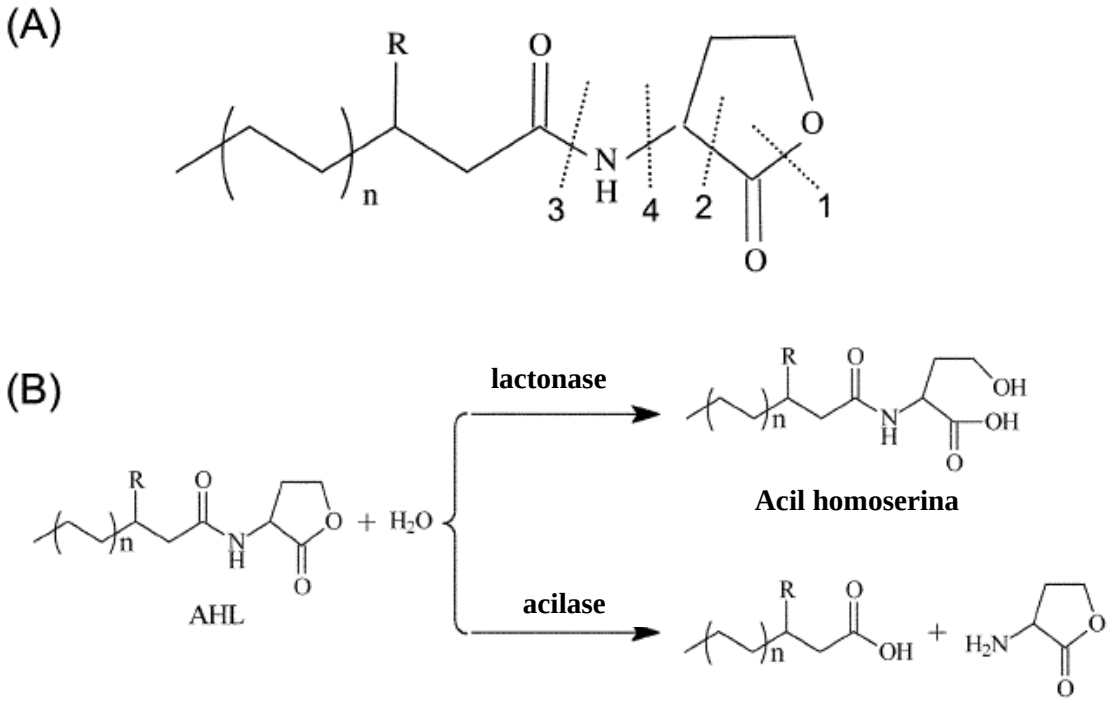


Figura 1: Estrutura geral da molécula sinal de AHL e o produto da degradação enzimática**.** (A) Estrutura geral e seus possíveis sítios de clivagem; (B) Mecanismo de degradação de lactonases e acilases. Fonte: DONG e ZHANG, 2005.

Em *Burkholderia thailandensis* a expressão de *aiiA* de *B. anthracis* impediu o acúmulo de *N*-decanoil homoserina lactona e *N*-octanoil homoserina lactona e reduziu as concentrações de *N*-hexanoil homoserina lactona, alterou a motilidade por espalhamento e contração, causou um aumento significante no tempo de geração e afetou o metabolismo de carbono (ULRICH, 2004). Esse mesmo autor demonstrou que a expressão de *aiiA* de *B. cereus* A24 em *B. thailandensis* reduziu a concentração das três AHLs a níveis não detectáveis, alterou a motilidade e afetou o metabolismo de carbono.

As enzimas acilases e deaminases podem separar a homoserina lactona da cadeia acil nos sítios 3 e 4 (Figura 1A). Entretanto, pouco é conhecido a respeito de mecanismos enzimáticos e especificidade das acilases (DONG e ZHANG, 2005).

LEADBETTER e GREENBERG (2000) reportaram uma estirpe de *V. paradoxus* (VAI-C) capaz de utilizar a AHL como única fonte de carbono e nitrogênio. Eles verificaram que *V. paradoxus* cliva a AHL com uma acilase e libera homoserina lactona e ácido graxo. Subsequentemente, o ácido graxo é utilizado como fonte de carbono via β-oxidação. Entretanto, ainda não foi elucidado como a bactéria obtém nitrogênio da fração homoserina lactona.

Ralstonia sp. XJ12B, isolada de um biofilme de espécies mistas, também é capaz de inativar AHL (LIN *et al*., 2003). A enzima responsável pela inativação de AHL (AiiD) foi purificada e misturada a *N*-3oxodecanoil-$_L$-homoserina lactona. A análise do produto de hidrólise demonstrou que a AiiD hidrolisa a ligação amida da AHL. A expressão da enzima AiiA em *P. aeruginosa* PAO1 transformada inibiu a motilidade por espalhamento do patógeno e reduziu a mortalidade do nematóide *Caenorhabditis elegans* em cerca de 15 %, quando comparada com a estirpe selvagem (LIN *et al*., 2003). MARTINS (2007) verificou que a estirpe de *E. cloacae* 067, isolada de leite cru refrigerado e que, por conjugação recebeu o gene *aiiA* de *Bacillus*, não foi capaz de acumular AHL.

Além de procariotos, os eucariotos também produzem enzimas capazes de hidrolisar AHLs. CHUN *et al.* (2004) mostraram que uma enzima de membrana do epitélio pulmonar humano foi responsável pela inativação da atividade das AHLs sintéticas C6-AHL e 3-oxo-C12-AHL, mas não de C4-AHL e 3-oxo-C6-AHL.

2.5. Aplicações biotecnológicas do bloqueio do sistema *quorum sensing*

Processos em que o bloqueio do sistema *quorum sensing* ocorrem naturalmente estão sendo avaliados como uma nova terapia antimicrobiana. A super expressão de *aiiA* em plantas de tabaco e tomate conferiram resistência a infecção por *Erwinia carotovora*, que requer AHL para controlar a expressão de fatores de virulência (DONG *et al*., 2001). Do mesmo modo, o cultivo da planta de batata, *Solanum tuberosum* L. cv. Binjet, inoculada com *Bacillus thuringiensis* reduziu a virulência mediada por *E. carotovora* de maneira dependente de *aiiA* (DONG *et al*., 2004). Estes exemplos mostram que a inibição do sistema *quorum sensing* oferece uma alternativa atrativa aos tradicionais antibióticos, pois estas estratégias não são bactericidas e a ocorrência de resistência bacteriana pode ser reduzida (WATERS e BASLER, 2005).

Compostos inibidores de *quorum sensing*, principalmente aqueles cujo alvo são as AHL, podem influenciar a colonização microbiana de superfícies de carnes, produção de toxinas e proliferação microbiana, podendo mais tarde, serem aplicados como conservantes de alimentos (PILLAI e JESUDHASAN, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DMB) e no Laboratório de Microbiologia Industrial (DMB) no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG.

3.1. Bactérias utilizadas

Foram utilizadas as estirpes *E. cloacae* 067, isolada de leite cru refrigerado granelizado (PINTO, 2004) e o transconjugante *E. cloacae* 067 (MARTINS, 2007). A identidade do isolado *E. cloacae* 067 foi confirmada pelo Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz. A estirpe transconjugante de *Enterobacter cloacae*, foi obtida por conjugação triparental utilizando como estirpe doadora *E. coli* S17-1 (pBHR1-*aiiA*-km^r) e estirpe helper *E. coli* HB101 (pRK600). A estirpe transconjugante carrega o plasmídeo pBHR1-*aiiA*-Km que confere a esta estirpe, resistência a kanamicina e a capacidade de síntese de lactonase de *Bacillus*, responsável pela clivagem do anel lactona das AHLs, o que compromete o sistema *quorum sensing*, pois impossibilita o transconjugante de acumular AHLs.

O estoque da cultura selvagem foi feito em caldo Luria Bertani - LB (triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 % e NaCl 0,4 %) e do transconjugante, em meio de cultura

LB acrescido de 50 μg . mL^{-1} de kanamicina. As culturas ativadas por 12 horas foram adicionadas a glicerol 50 %, e foram mantidas congeladas a – 80 °C. Antes de cada experimento, as células foram reativadas por duas inoculações consecutivas em caldo LB acrescido ou não de 50 μg . mL^{-1} de kanamicina, com incubação a 30 °C por 16 horas, sob agitação.

Para a verificação da produção de AHLs, foram utilizadas as estirpes monitoras *Chromobacterium violaceum* CV026 e *Escherichia coli* pBS403. *C. violaceum* CV026 é 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). Portanto, o resultado foi considerado positivo quando observada a produção do pigmento violaceína por *C. violaceum* CV026. *E. coli* pSB403 é uma estirpe transformante que produz luminescência na presença de AHLs exógenas de cadeias laterais de seis a oito carbonos com ou sem substituintes oxo. O resultado foi considerado positivo quando *E. coli* pSB403 produziu luminescência.

3.2. Avaliação da produção de AHLs

A confirmação de que a estirpe transconjugante de *E. cloacae* 067 conservava o gene *aiiA* foi feita em bioensaio de estria cruzada (STEIDLE, 2001) em ágar LB, utilizando as estirpes monitoras *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pBS403.

A produção de AHL por *E. cloacae* também foi verificada em meio mínimo de sais - MMS (K_2HPO_4 7 g . L^{-1}; KH_2PO_4 2 g . L^{-1}; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 g . L^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g . L^{-1}; glicerol 4 g . L^{-1} e $CaCl_2$ 1 mmol . L^{-1}) utilizando as estirpes monitoras *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403. A estirpe *E. cloacae* 067 foi ativada em 10 mL de meio de cultura LB a 30 °C, por aproximadamente, 24 horas. Posteriormente, a cultura foi centrifugada em microcentrífuga a 4.300 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em mesmo volume de solução salina 0,85 %, seguindo-se nova centrifugação na mesma velocidade e tempo. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e a densidade óptica das células foi padronizada em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron Corporation, Madison WI, EUA) a 600 nm de forma a se obter uma população equivalente a 10^7 UFC . mL^{-1}. Alíquota de 1 mL da cultura padronizada foi transferida para 100 mL de caldo MMS e incubada a 30

ºC, por 96 horas, sob agitação. Nos tempos 0, 20, 48, 72 e 96 horas alíquotas foram retiradas para a contagem de células pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) e para a avaliação da produção de AHL.

Para a determinação de AHL, alíquotas de 3 mL da cultura foram centrifugadas em microcentrífuga a 4.300 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi esterilizado por filtração em membranas de 0,22 μm e 25 mm de diâmetro (Schleicher & Schuell, Brasil) e desidratados por liofilização. Após a liofilização, as amostras foram adicionadas de 50 mM de Tris-HCL pH 7,0 e estocadas a – 20 °C até a realização do ensaio. Alíquotas de 1 mL de culturas de *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403 cultivadas em meio de cultura LB por 24 horas, foram adicionadas a 100 mL de ágar LB 0,75 % a temperatura de 50 °C e vertidas em placas de Petri. Dois pocinhos foram feitos em cada placa contendo as estirpes monitoras e, a eles, adicionados 50 μL dos extratos concentrados de *E. cloacae* 067 coletados nos diferentes tempos de cultivo. As placas inoculadas com *C. violaceum* CV026 foram incubadas a 30 °C e as inoculadas com *E. coli* pSB403 foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Como controle positivo foi utilizado 50 μL de 0,01 mg . mL^{-1} de hexanoil homoserina lactona (HHL) sintética e, como controle negativo, 50 μL de MMS.

3.3. Determinação de temperaturas de crescimento

E. cloacae selvagem e transconjugante foram cultivadas, por aproximadamente, 18 horas a 30 ºC, sob agitação de 150 rpm, em 10 mL de meio de cultura LB apropriado para cada estirpe. Alíquotas das culturas ativas foram adicionadas a 3 mL de caldo LB apropriado, até que se alcançasse a absorvância de 0,1, correspondendo a, aproximadamente, 10^7 UFC . mL^{-1}. A incubação foi feita a temperaturas variando de 4 °C a 43 °C. A absorvância foi medida de 30 em 30 minutos por até 6 horas e, posteriormente, em intervalos de tempo variáveis até 80 horas, em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron Corporation, Madison WI, EUA) a 600 nm.

3.4. Determinação de crescimento em diferentes meios de cultivo

Células de *E. cloacae* 067 foram cultivadas por, aproximadamente, 18 horas a 30 ºC, sob agitação, em 5 mL de meio de cultura LB apropriado para cada estirpe. Em seguida, a absorvância da suspensão de células foi padronizada de forma a se obter uma população equivalente a 10^7 UFC . mL^{-1}, conforme descrito no item 3.1. Alíquotas de 20 µL dessa suspensão foram inoculadas em 180 µL de caldo LB, TYEP (triptona 10 g L^{-1}, extrato de levedura 2,5 g . L^{-1}, K_2HPO_4 1 g . L^{-1}, KH_2PO_4 1 g . L^{-1}), TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % , meio ABC (CLARK e MAALØE, 1967) e MMS, distribuídos em microplacas de poliestireno com 96 poços. Naqueles meios destinados ao cultivo de *E. cloacae* transconjugante, foram adicionados 50 µg . mL^{-1} de kanamicina. As placas foram incubadas a 30 °C, sem agitação. Em determinados períodos de tempo, durante 54 horas, a absorvância da suspensão de células foi determinada a 630 nm em leitora de Elisa Versa Max (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

3.5. Determinação de motilidade por espalhamento e por contração

Para a determinação da motilidade por espalhamento, culturas ativadas de *E. cloacae* selvagem ou transconjugante, foram inoculadas no centro de placas contendo meio mínimo ABC (CLARK e MAALØE, 1967) suplementado com 0,25 % de casaminoácidos e solidificado com 0,7 % de ágar (EBERL *et al*., 1999), acrescido de 50 µg . mL^{-1} de kanamicina para cultivo do transconjugante. Foram utilizadas como controles positivo e negativo, as estirpes de *S. liquefaciens* MG 1 e MG 44, respectivamente. *S. liquefaciens* MG 44 é mutante da estirpe MG 1 e não apresenta motilidade por espalhamento (EBERL *et al*., 1996). O padrão de motilidade das estirpes foi observado após 24 horas de incubação a 30 °C. Para a avaliação da motilidade por contração, o mesmo procedimento foi utilizado, substituindo o meio de cultura ABC por meio de cultura LB acrescido de 1% de ágar e o período de incubação foi de 48 horas (ULRICH, 2004).

3.6. Determinação de formação de biofilme em placas de poliestireno

Alíquotas de 20 μL da suspensão de células de *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante, contendo cerca de 10^7 UFC . mL^{-1}, preparadas conforme descrito no item 3.1, foram inoculadas em 180 μL dos respectivos meios LB contidos em microplacas de poliestireno de 96 poços. A incubação foi a 30 ºC, por até 72 horas. Durante o período de incubação, a absorvância da suspensão de células foi determinada a 630 nm e, em seguida, o meio de cultura foi removido, invertendo-se a microplaca sobre papel absorvente. As células aderidas às microplacas foram coradas por 30 minutos com 200 μL de cristal violeta a 0,1 % (p/v) em água. Em seguida, o corante foi descartado e os poços das microplacas foram lavados delicadamente, por três vezes consecutivas, com 200 μL de água destilada. As placas foram secas em estufa a 40 ºC, por 15 minutos. O cristal violeta retido pelas células aderidas foi dissolvido em 200 μL de etanol (95 %) e a absorvância medida a 630 nm (CONWAY *et al.*, 2002) em leitora de Elisa Versa Max (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

O mesmo procedimento foi realizado substituindo-se o meio LB pelo MMS, caldo TYEP e caldo TYEP adicionado de 0,25 g . L^{-1} de $CaCl_2$ e, para cultivo da estirpe transconjugante, cada meio de cultura foi acrescentado de 50 μg.mL^{-1} de kanamicina.

3.7. Determinação da formação de biofilme em cupons de aço inoxidável

Foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304, acabamento # 4, nas dimensões de 2,0 x 6,0 x 0,1 cm perfurados em um dos vértices. A manutenção dos cupons suspensos e imersos no meio de cultura líquido foi realizada conforme descrito por MACHADO (2006). Para limpeza e esterilização, os cupons e os fios de níquel-cromo foram tratados segundo procedimentos descritos por ANDRADE *et al*. (1998), com modificações. Os cupons foram submetidos à escovação com detergente líquido e enxaguados em água destilada. Resíduos de gordura foram retirados pela imersão em acetona durante 30 minutos. A seguir, foram imersos em solução de NaOH 1 % durante 1 hora e enxaguados várias vezes com água destilada (PINTO, 2004). Após secagem ao

ar, cada cupom foi preso na extremidade do fio de níquel-cromo, embrulhado em papel kraft e esterilizado a 121 ºC, durante 15 minutos, em autoclave (MACHADO, 2006).

Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 280 mL de MMS ou TYEP foram esterilizados em autoclave a 121 ºC durante 15 minutos. Para o cultivo do transconjugante, os meios foram suplementados com 50 μg . mL^{-1} de kanamicina, após a esterilização. Os meios de cultivo foram inoculados com uma alíquota de 2,8 mL das estirpes de *E. cloacae* selvagem e transconjugante ativadas no meio de cultura LB, conforme descrito no item 3.1, padronizadas em densidade óptica equivalente a, aproximadamente, 10^8 UFC . mL^{-1}. Após inoculação e homogeneização, 14 cupons de aço inoxidável esterilizados foram imersos no meio de cultura seguindo-se de incubação a 30 °C. Dois cupons foram retirados imediatamente após a inoculação, sendo um deles usado para a quantificação de células aderidas em tempo inicial do experimento e o segundo tratado para observação em microscópio de epifluorescência. A cada 24 horas, os cupons foram assepticamente removidos, lavados em 280 mL de solução salina esterilizada e transferidos para um novo frasco contendo 280 mL de meio previamente inoculado como descrito acima, segundo metodologia descrita por JOSEPH *et al*. (2001). A cada período de tempo definido (16, 24, 48, 72 e 96 horas), um cupom foi retirado, para posterior quantificação de células aderidas, e outro, para observação em microscopia de epifluorescência.

3.7.1. Quantificação de células aderidas

Para quantificação das células aderidas, os cupons foram retirados dos frascos de cultura nos diferentes tempos de amostragem e lavados em solução salina esterilizada, para retirada de células não-aderidas. A seguir, foram mergulhados em 20 mL de salina esterilizada contida em tubos de ensaio e submetidos à ação de ultra-som (Ultrasonic Cleaners – Model 1510), durante 30 minutos, para remoção das células aderidas. Essa suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos e uma alíquota foi retirada para o preparo de diluições decimais para serem plaqueadas pela técnica de microgotas em ágar padrão para contagem (PCA). Após incubação por 18 a 24 horas a 30 ºC, a contagem de colônias foi feita em lupa (Olympus – SZ40).

3.7.2. Observação de biofilmes por microscopia de epifluorescência

Os cupons removidos dos meios de cultivo foram lavados com solução fosfato de potássio (KH_2PO_4 68 g . L^{-1}, pH 7,2) e afixados em lâminas de microscopia com fita adesiva dupla-face. Foram recobertos com solução Kirkpatrick (álcool isopropílico, clorofórmio e formaldeído, 6:3:1) durante 10 minutos, para fixação das bactérias. A seguir, foram, recobertos com alaranjado de acridina a 0,04 % em água, durante 5 minutos (PARIZZI, 1999). O excesso de corante foi retirado com enxágüe brando com solução fosfato de potássio. Procedeu-se ao exame dos cupons corados em microscópio de epifluorescência, modelo PX60 (Olympus, Japão), em aumento de 400 e 1.000 vezes e com os filtros WB e WG.

3.8. Avaliação das atividades amilolítica, celulolítica e pectinolítica

Alíquotas de 10 μL das culturas ativas das estirpes de *E. cloacae* foram inoculadas no centro de placas de Petri contendo os meios sólidos acrescentados dos substratos das enzimas avaliadas. A presença da enzima amilase foi avaliada em ágar nutriente contendo 0,2 % amido (STAMFORD *et al*., 1998), a atividade celulolítica foi avaliada em ágar carboximetilcelulose (STAMFORD *et al*., 1998) e a presença de pectinases foi verificada em ágar pectina de frutas cítricas (HANKIN *et al*., 1971). A incubação foi a 30 °C por até 72 horas.

3.9. Avaliação da atividade lipolítica

Para a verificação da atividade lipolítica de *E. cloacae* foi utilizado ágar tributirina (HAAS, 2001). Uma alíquota de 20 μL das culturas de *E. cloacae* selvagem e transconjugante, ativadas por 18 horas a 30 °C, foi inoculada na superfície do ágar tributirina. Após o período de incubação a 30 °C por 72 horas, a presença e o tamanho de halo de clarificação foram verificados.

3.10. Avaliação e quantificação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada em meios de cultura contendo como substrato, gelatina (peptona de carne 0,5 %, extrato de carne 0,3 % e gelatina 12 %), caseína em ágar caseinato (MARCY e PRUETT, 2001) ou ágar LB suplementado com 2 % de leite desnatado reconstituído. O meio gelatina foi incubado por 12 dias a 30 °C e a revelação foi feita incubando os tubos a 8 °C. A não solidificação do meio indicou a utilização da gelatina. O ágar caseínato e ágar LB suplementado com 2 % de leite desnatado foram incubados a 30 °C por 48 horas e após este período, na presença de halo de clarificação foi usado como indicativo da atividade proteolítica.

A quantificação da atividade proteolítica foi realizada conforme descrito por CHRISTENSEN *et al*. (2003). Alíquotas das culturas de *E. cloacae* selvagem e transconjugante cultivadas a 30 °C em meio TYEP acrescido de 0,25 % de cloreto de cálcio foram coletadas e esterilizadas por filtração. Volumes de 150 μL dessas amostras foram adicionadas a 250 μL de 2% (p/v) de azocaseína, seguindo de incubação por 12 horas a 30 °C. A reação enzimática foi cessada pela adição de 1,2 mL de de ácido tricloroacético 10 % (p/v). A mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e então, centrifugada por 10 minutos a 4.300 *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 440 nm em espectrofotômetro (Beckman DU640, EUA) A atividade específica da enzima foi determinada pela razão entre absorvância a 440 nm pela concentração de proteínas totais na amostra e pelo tempo de reação.

3.11. Grau de proteólise

A indicação da presença de proteases nas estirpes de *E. cloacae* também foi realizada por determinação do grau de proteólise, medido pela liberação da tirosina no leite (HULL, 1947). Uma alíquota de 5 mL da amostra de leite inoculada com as estirpes selvagem ou transconjugante de *E. cloacae* foi adicionada a 10 mL de ácido

tricloroacético 0,72 mol . L^{-1} e 1 mL de água destilada. Após agitação e repouso de 10 minutos, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 42. Foram coletados 5 mL do filtrado e adicionados a 10 mL de solução de carbonato de sódio e tetrafosfato de sódio, a 40 °C. Após 10 minutos, foram adicionados 3 mL de reagente fenólico, sob agitação. A leitura foi feita após cinco minutos, em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron Corporation, Madison WI, EUA), a 650 nm. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em equivalente de tirosina, empregando-se uma curva padrão, previamente preparada, com soluções de tirosina com concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em miligramas de tirosina por 5 mL de leite.

3.12. Zimograma

A atividade proteolítica das estirpes de *E. cloacae* foi analisada em zimograma contendo azocaseina ou gelatina como substrato. Como controle positivo foi utilizado o sobrenadante livre de células da estirpe *P. fluorescens* 041. Alíquotas do sobrenadante livre de células das estirpes selvagem e transconjugante cultivadas em caldo TYEP + 0,25 % $CaCl_2$ incubados por 36 horas a 30 °C sob agitação, concentradas 15 vezes por liofilização e em leite desnatado reconstituido 12 % (LDR 12 %), tiveram as proteínas quantificadas. Esses sobrenadantes foram adicionados de um volume correspondente 1/3 de tampão de amostra e submetidas à fervura por 10 minutos. Posteriormente, alíquotas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) acrescido de 0,2 % de azocaseina. Após eletroforese a 100 mV, por aproximadamente, 2 horas, as proteínas foram renaturadas, incubando-se o gel em solução de Tris-HCl 50 mmol . L^{-1} (pH 7,5) acrescido de isopropanol 25% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, o gel foi incubado em Tris-HCl 50 mmol . L^{-1} (pH 7,5) por 15 minutos. 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 horas a 4 °C. Após a renaturação, o gel foi incubado por 24 horas em Tris-HCl 50 mmol . L^{-1} (pH 7,5) contendo 0,25 % de $CaCl_2$ 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).

O mesmo procedimento foi realizado para o zimograma de gelatina com algumas modificações. Foi adicionado ao gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE), 0,2

% de gelatina. As amostras não foram submetidas à fervura antes de serem aplicadas no gel. Após a eletroforese, o gel foi lavado por 30 minutos em 2,5 % e 1 % de Triton X-100 seguido por três lavagens em tampão de protease (Tris-HCl 0,1 mol.L^{-1}, pH 8,0 / $CaCl_2$ 0,5 mmol . L^{-1}). Em seguida, o gel foi incubado por 10 dias em tampão de protease a 30 °C (ZHU *et al*., 2002). A atividade de enzimas proteolíticas no gel foi observada como zonas claras, resultantes da hidrólise de gelatina após o gel ser corado com azul de Coomasie.

3.13. Avaliação da atividade proteolítica por coagulação do leite

A atividade proteolítica também foi avaliada pela coagulação de LDR 12 % e do leite pasteurizado. Amostras de LDR 12 % e leite pasteurizado foram inoculadas com 10^4, 10^6 e 10^7 UFC . mL^{-1} das estirpes de *E. cloacae* selvagem e transconjugante e incubadas a 30 °C por 96 horas, sob agitação. Durante o período de incubação, foi feita a observação visual da coagulação do leite, conforme realizado por CHRISTENSEN *et al*. (2003).

3.14. Avaliação do perfil proteínas extracelulares de *E. cloacae* selvagem e tranconjugante

As proteínas do extrato extracelular foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com LAEMMLI (1970), em Sistema Mini-Protean® II, com fonte Power Pac 300 - Bio-Rad. Alíquotas do extrato protéico livre de células das estirpes selvagem e transconjugante cultivadas em caldo TYEP + $CaCl_2$ incubados por 36 horas a 30 °C sob agitação, foram liofilizadas e ressuspendidas em 50 mM de Tris-HCL pH 8,0, de forma a obter o sobrenadante concentrado cerca de 15 vezes. As proteínas das amostras foram quantificadas e o volume contendo 60 μg e 86 μg de proteína foram adicionadas ao tampão da amostra e submetidas à fervura por 10 minutos. Posteriormente, um volume máximo de 40 μL foi aplicado em gel de

poliacrilamida 12 %. O gel foi submetido à eletroforese a 100 mV, por aproximadamente 2 horas e, em seguida, foi corado com o corante azul de Coomasie coloidal G-250.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de AHL pelas estirpes de *E. cloacae* 067

A indução das estirpes sensoras de AHLs, *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403, pela estirpe transconjugante *E. cloacae* 067 não foi observada no bioensaio de estrias cruzadas em ágar LB após 24 horas de incubação. Este resultado confirmou a expressão do gene *aiiA* no transconjugante que, consequentemente, se tornou incapaz de acumular AHL.

A produção de AHL pela estirpe selvagem de *E. cloacae* 067 foi observada no bioensaio em ágar LB, confirmando os resultados obtidos por MARTINS (2007). A presença de AHL também foi constatada no sobrenadante da cultura de *E. cloacae* 067 selvagem cultivada em MMS, adicionado de glicerol como fonte de carbono e concentrado 10 vezes por liofilização. Neste ensaio, a estirpe monitora *C. violaceum* CV026 detectou a presença de AHL nos sobrenadantes coletados nos tempos de incubação de 48 e 96 horas. Entretanto, a estirpe monitora *E. coli* pSB403 detectou AHL nos sobrenadantes coletados a partir de 20 horas de incubação, quando a população de *E. cloacae* 067 atingiu 1,0 x 10^9 UFC . mL^{-1}. Este resultado indica a maior sensibilidade de *E. coli* pBS403 à presença de AHLs exógenas produzidas por *E. cloacae* 067. Segundo STEINDLER e VENTURI (2007), *E. coli* pBS403 é sensível a AHL de cadeias laterais de seis a oito carbonos com substituintes oxo, enquanto a estirpe monitora *C. violaceum* CV026 responde muito bem a AHL com seis carbonos na cadeia lateral, mas fracamente a AHL com substituintes oxo. De fato, MARTINS

(2007) verificou que *E. cloacae* 067 produz 3-oxo-C6-AHL além de C6-AHL. Entretanto, esse autor não detectou a presença de AHL, por espectrometria de massa, em extrato de AHL obtido do sobrenadante livre de células de *E. cloacae* 067, cultivada em meio mínimo ABG, contendo glicose como única fonte de carbono, por 20 horas a 30 °C, sob agitação. A influência do meio de cultura e da fonte de carbono na produção de AHL já foi verificada (MEDINA-MARTÍNEZ *et al.* 2006). Além da variação no meio de cultivo, outro fator que pode explicar a diferença do resultado obtido com a mesma estirpe de *E. cloacae* 067 neste estudo e por MARTINS (2007) é o uso do sobrenadante da cultura concentrado. É possível que o crescimento de *E. cloacae* 067 em meio mínimo resulte em menor produção de AHL e a concentração do sobrenadante em 10 vezes, como feito no presente estudo, permitiu a detecção de quantidades menores de AHL.

4.2. Crescimento *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante em diferentes temperaturas

Estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 cresceram na faixa de temperatura de 4 a 43 °C (Figuras 2 e 3). A temperatura ótima de crescimento de *E. cloacae* é 30 °C, sendo que alguns isolados clínicos crescem a 37 °C (MURRAY, 1983). Segundo JAY (2005), *E. cloacae* cresce bem a 7 °C por 30 dias e também é capaz de crescer bem a 43 °C.

Os parâmetros cinéticos de crescimento bacteriano (Tabela 2) evidenciaram maiores velocidades específicas de crescimento (μ) em temperaturas entre 30 a 43 °C. Embora os maiores valores μ tenham ocorrido a 41 °C, a absorvância máxima das culturas, determinadas a 600 nm, não alcançou os valores máximos, constatados quando as culturas foram incubadas a 30 °C (Figuras 2 e 3). A 41 °C as estirpes atingem a fase estácionária precocemente. DUNSTALL *et al.* (2005) avaliaram o efeito de nove AHLs sintéticas no crescimento de *P. fluorescens* isoladas de leite e constataram que *N*-benzoiloxicarbonil-L-homoserina lactona e *N*-3-oxihexanoil-DL-homoserina lactona reduziram a duração da fase lag e aumentaram a taxa de crescimento de três estirpes avaliadas. Neste estudo, a presença da AHL reduz a velocidade específica de crescimento a temperaturas acima de 17 °C.

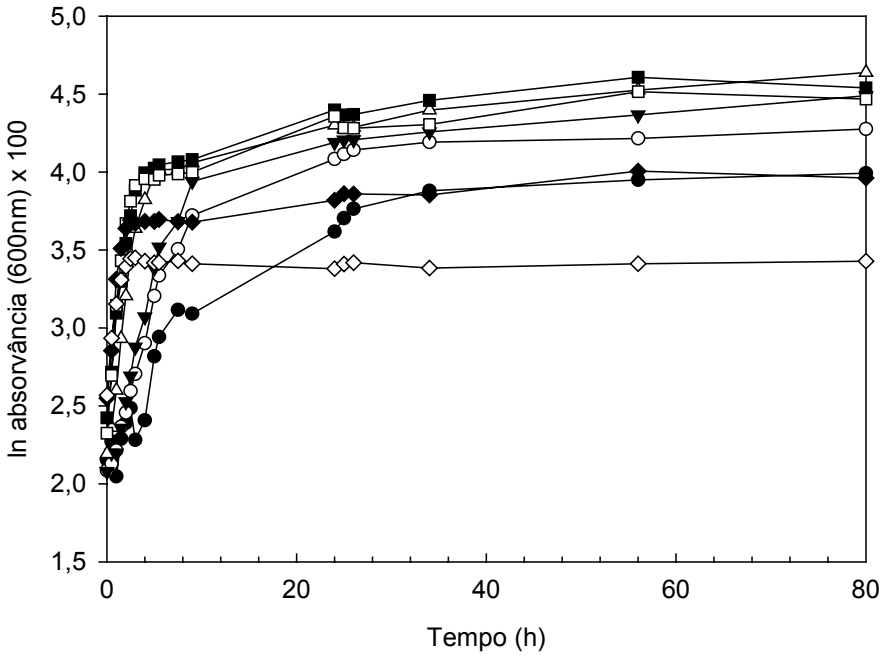


Figura 2 - Crescimento da estirpe selvagem *E. cloacae* 067 em meio LB, incubado as temperaturas de 4 a 43 °C por 80 horas. -●- 4 °C; -o- 8 °C; -▼- 17 °C; -Δ- 26 °C; -■- 30 °C; -□- 36 °C; -◆- 41 °C; -◇- 43°C.

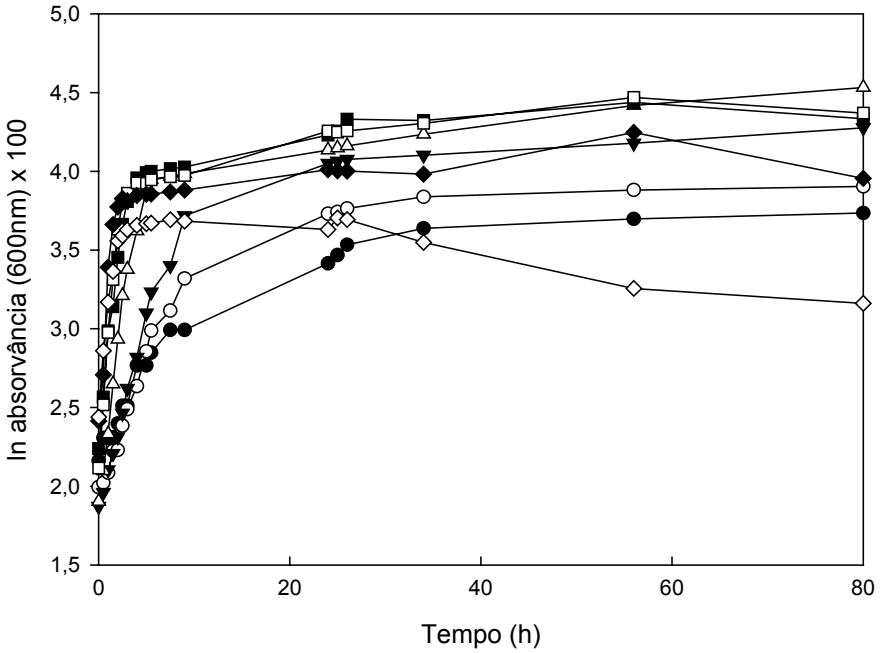


Figura 3 - Crescimento da estirpe transconjugante *E. cloacae* 067 em meio LB, incubado as temperaturas de 4 a 43 °C por 80 horas. -●- 4 °C; -o- 8 °C; -▼- 17 °C; -Δ- 26 °C; -■- 30 °C; -□- 36 °C; -◆- 41 °C; -◇- 43°C.

Os resultados também revelaram a tendência da velocidade específica de crescimento da estirpe transconjugante ser menor a temperaturas de até 17 °C, quando comparada à estirpe selvagem e maior quando em temperaturas acima de 30 °C (Tabela 2). A adição de 50 μg . mL de kanamicina ao meio de cultivo da estirpe transconjugante pode estar contribuindo para esta menor velocidade específica de crescimento a temperaturas menores que 17 °C. A baixa temperatura e a adição de antibiótico são fatores de estresse que podem contribuir para a menor velocidade específica de crescimento.

Tabela 2 - Velocidade específica de crescimento de *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante inoculadas em caldo LB e incubadas a diferentes temperaturas.

Estirpe	Temperatura (°C)							
E. cloacae 067	4	8	17	26	30	36	41	43
Selvagem	0,152	0,237	0,268	0,529	0,672	0,685	0,919	0,730
Transconjugante	0,118	0,185	0,245	0,535	0,748	0,766	0,944	0,861

4.3. Crescimento das estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 em diferentes meios

Observou-se que ambas as estirpes de *E. cloacae* cresceram melhor nos meios mais ricos, LB, TYEP e TYEP + 0,25 % $CaCl_2$ (Figuras 4 e 5). Os maiores valores de absorvância obtidos nesses meios de cultivo se justificam, pois se tratam de substratos nutricionalmente ricos, que contêm compostos como triptona, peptona e extrato de levedura. Os meios MMS e ABC são meios pobres e quimicamente definidos, sendo menos favoráveis ao crescimento microbiano.

Independente do meio de cultivo, a estirpe transconjugante apresentou maior velocidade específica de crescimento do que a estirpe selvagem ($p < 0,05$) (Tabela 3).

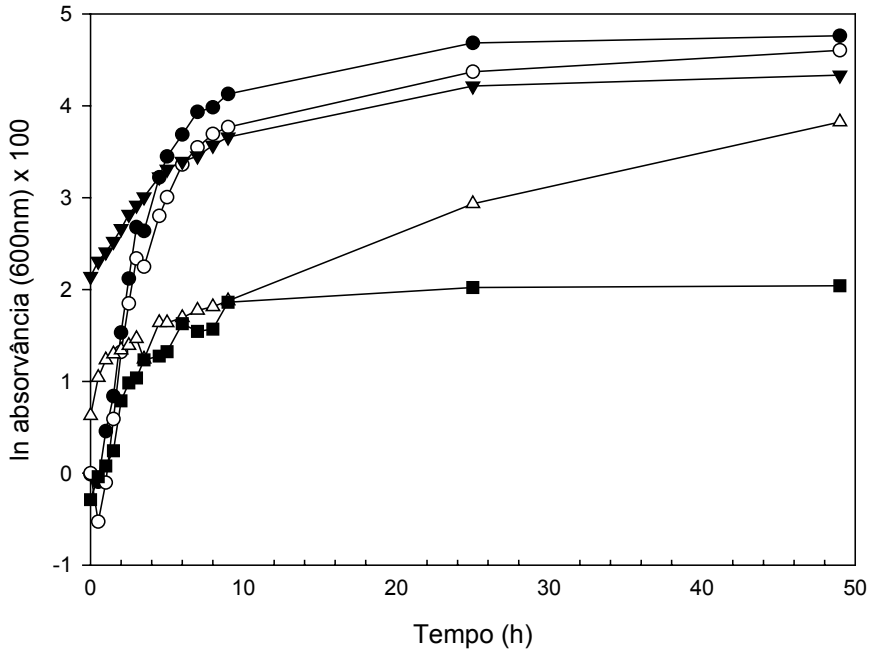


Figura 4 - Crescimento da estirpe selvagem *E. cloacae* 067 em meios LB, TYEP, TYEP + 0,25 % $CaCl_2$, MMS e ABC, incubadas a 30 °C por 48 horas. -●- LB; ··○·· TYEP; -▼- TYEP + 0,25 % $CaCl_2$; -Δ- MMS; -■- ABC.

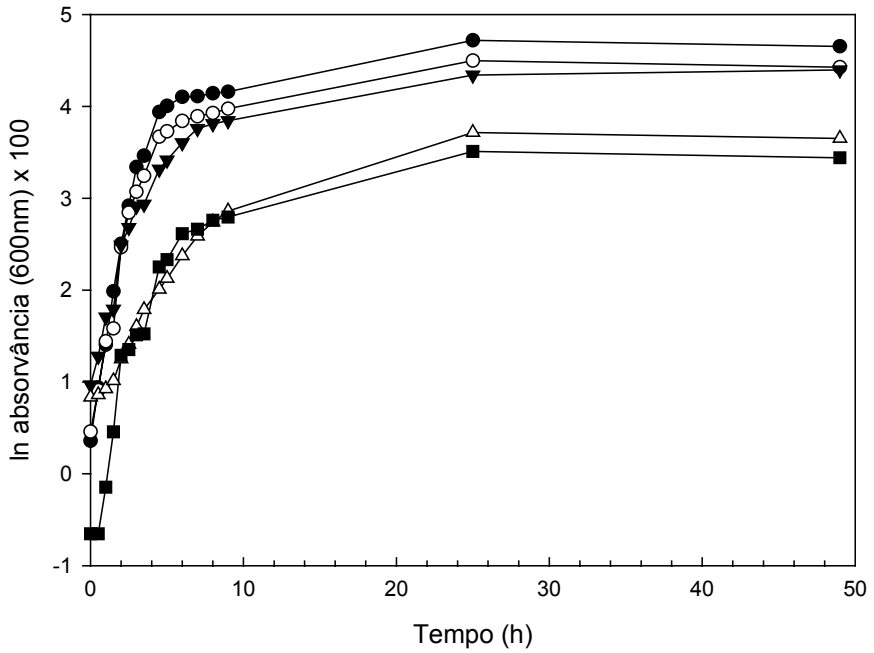


Figura 5 - Curva de crescimento da estirpe transconjugante *E. cloacae* em meios LB, TYEP, TYEP + 0,25 % $CaCl_2$, MMS e ABC, incubadas a 30 °C por 48 horas. -●-LB; ··○·· TYEP; -▼- TYEP + 0,25 % $CaCl_2$; -Δ-MMS; -■- ABC.

Tabela 3 - Velocidade específica de crescimento das estirpes de *E. cloacae* inoculadas em meios LB, TYEP, TYEP + $CaCl_2$, MMS e ABC, incubadas a 30 °C por 48 horas.

Estirpe *E. cloacae* 067	Meios de cultivo				
	LB	TYEP	TYEP + 0,25 % $CaCl_2$	MMS	ABC
Selvagem	0,969	0,833	0,460	0,124	0,267
Transconjugante	1,000	1,110	0,969	0,360	0,371

4.4. Motilidade

A motilidade por espalhamento (*swarming*) não foi verificada em ambas as estirpes de *E. cloacae* 067 (Figura 6). Esse tipo de motilidade, importante na colonização rápida de superfícies, ocorre em razão do movimento de flagelos com arranjo peritríquio, os quais devem funcionar como propulsores helicoidais dirigidos por um motor biológico. Em *S. liquefaciens* foi demonstrado que a iniciação da diferenciação em células chamadas de *swarmer,* envolve a regulação por moléculas sinalizadoras, *N*-butanoil-$_L$-homoserina lactona e *N*-hexanoil-$_L$-homoserina lactona liberadas no meio de crescimento (EBERL *et al*., 1996; EBERL *et al*., 1999). Mutantes incapazes de sintetizar AHL não apresentaram motilidade por espalhamento, que foi restaurada pela adição de AHL exógena (EBERL *et al*., 1996).

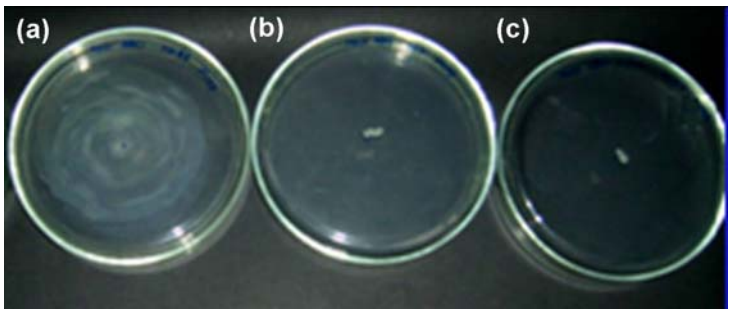


Figura 6 - Motilidade por espalhamento em ágar ABC com as estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 a 30 °C por 24 horas. (a) *S. liquefaciens* MG1 (controle positivo); (b) *E. cloacae* 067 selvagem; (c) *E. cloacae* 067 transconjugante.

A motilidade por contração não variou nas estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067. Estes resultados sugerem que esse tipo de motilidade não está sob a

regulação do mecanismo de *quorum sensing* neste isolado, como ocorre em outras bactérias. Em B. *thailandensis*, a expressão do gene *aiiA* alterou a motilidade por espalhamento e contração (ULRICH , 2004).

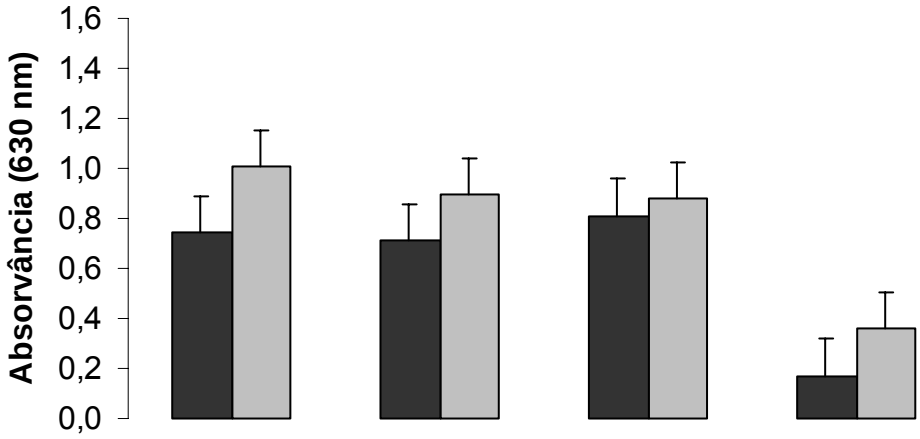
4.5. Formação de biofilmes em placas de poliestireno

Os valores de absorvância representativos do crescimento das estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 em meios de cultura ricos e mínimo, em poços da placa de poliestireno, confirmaram o crescimento mais rápido da estirpe transconjugante a 30 °C, que atingiu população máxima após 24 horas de incubação (Figura 8).

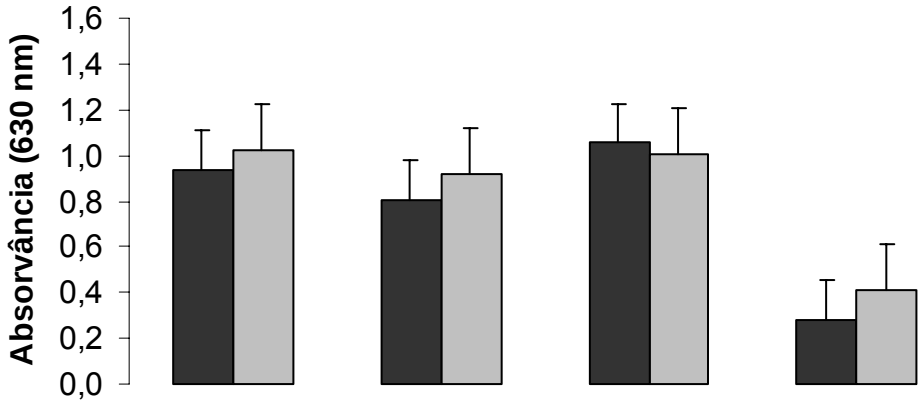
As estirpes *E. cloacae* selvagem e transconjugante foram capazes de formar biofilmes na superfície de poliestireno tanto em meio rico, TYEP e LB, quanto em meio mínimo, evidenciado pela medida da absorvância do cristal violeta retido nas células aderidas (Figura 9). Maior adesão foi constatada quando *E. cloacae* 067 foi cultivada em LB e TYEP, embora a adição de cálcio ao meio TYEP tenha reduzido a adesão da estirpe selvagem (Figura 9). Estes resultados são diferentes dos encontrados por VIANA (2006), que observou maior adesão de 12 estirpes de *P. fluorescens* quando cultivadas em meios mínimos como MMS e ABC do que em meios nutricionalmente ricos. Outros autores também relatam que, condições de restrição nutricional e presença de íons são favoráveis à formação de biofilmes. RICE e KOH (2005) verificaram que a redução ou limitação de nutrientes desempenha um papel na transição entre um biofilme filamentoso de *S. marcescens* para um biofilme na forma de microcolônia. Cátions divalentes como Mg^{2+} e Ca^{2+} podem influenciar diretamente a formação dos biofilmes por meio de interações eletrostáticas e, indiretamente, via processos de adesão dependentes da fisiologia, pois podem possuir funções celulares importantes como, por exemplo, os co-fatores de enzimas (FLETCHER *et al*., 1988).

A avaliação do potencial de adesão das estirpes *E. cloacae* 067 em relação à densidade celular também confirmou que a incapacidade do transconjugante em acumular AHL afetou negativamente ($p < 0,05$) a formação de biofilmes por esta estirpe nos meios LB, TYEP e MMS (Figura 10). Estudos de microscopia eletrônica mais detalhados deverão ser feitos para elucidar as etapas de formação de biofilmes reguladas pelo mecanismo de *quorum sensing* em *E. cloacae* 067.

A) 24 horas



B) 48 horas



C) 72 horas

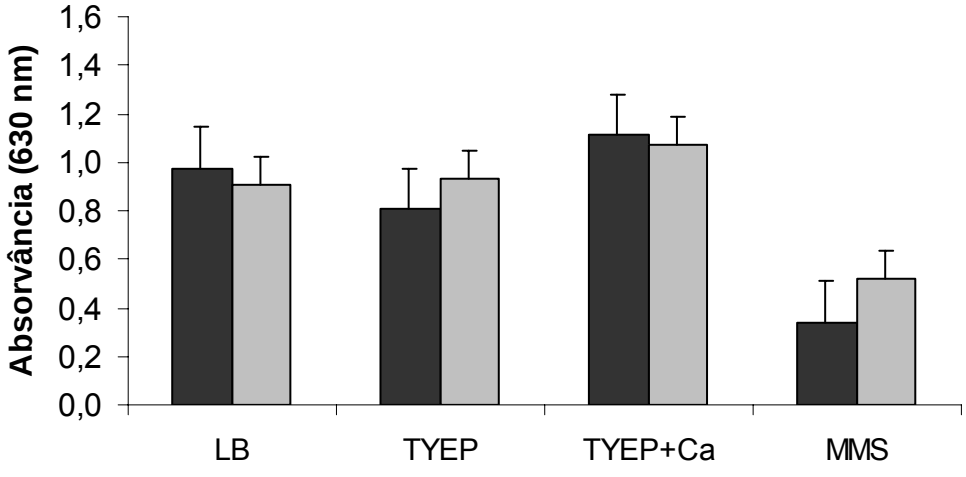
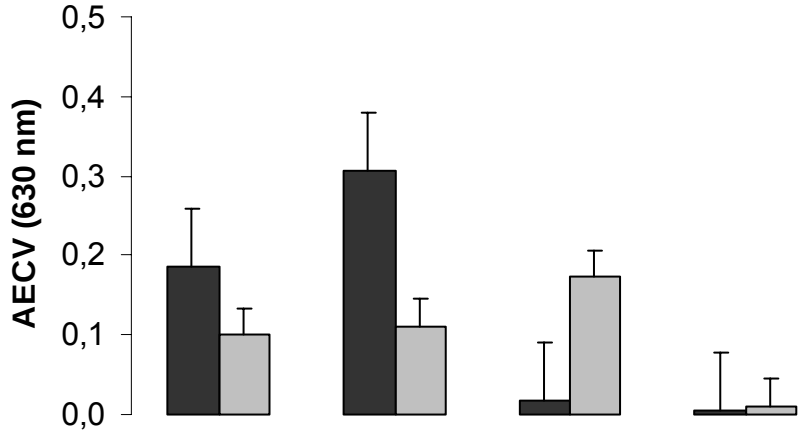
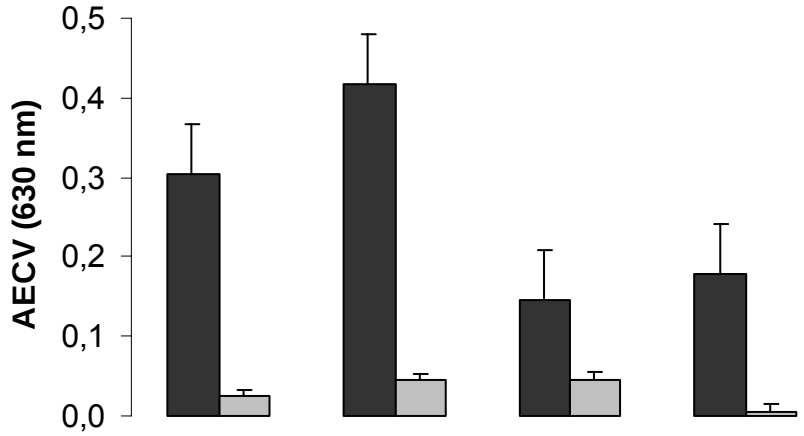


Figura 8 - Crescimento (absorvância 630 nm) das culturas de *E. cloacae* 067 selvagem (■) e transconjugante (■) em meios LB, TYEP, TYEP + 0,25 % $CaCl_2$ e MMS, após incubação a 30 ºC por 24, 48 e 72 horas. A) 24 horas; B) 48 horas e C) 72 horas.

A) 24 horas



B) 48 horas



C) 72 horas

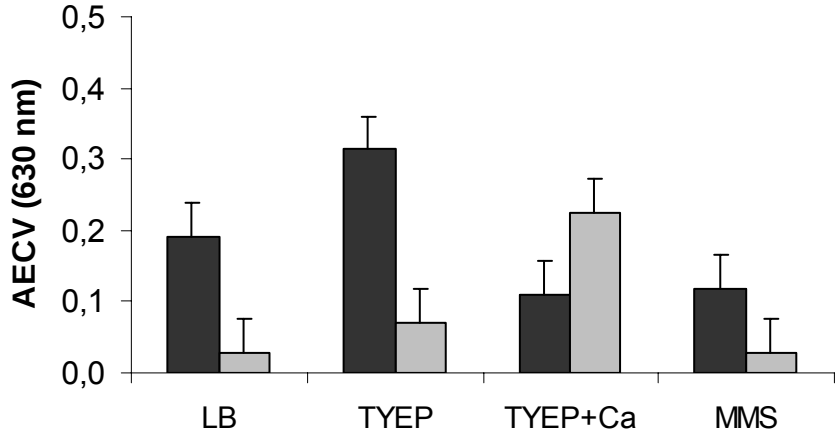
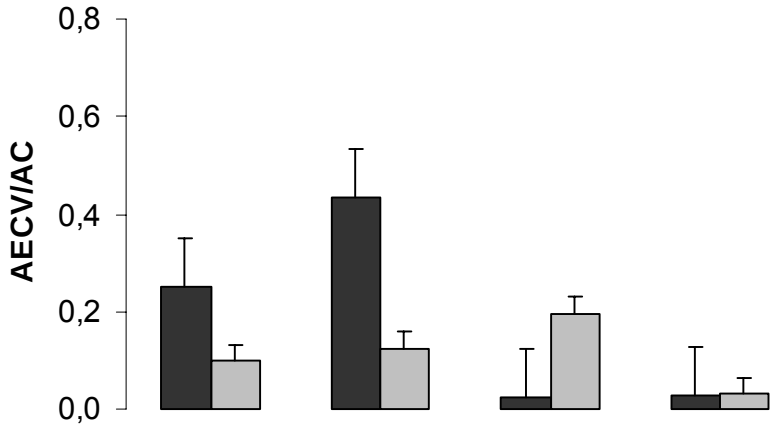
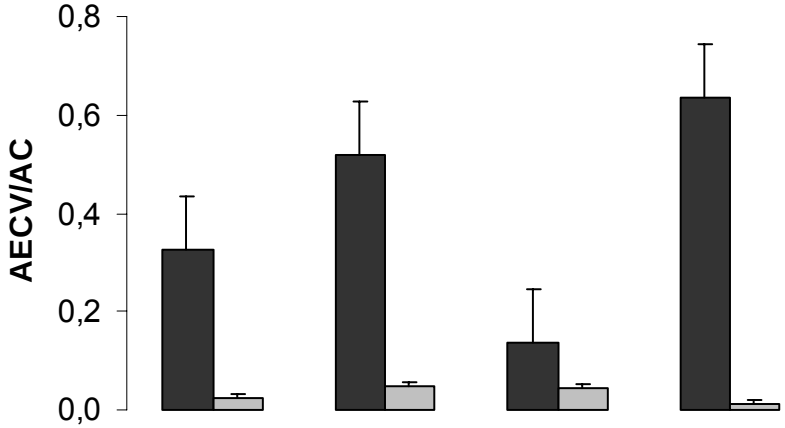


Figura 9 - Formação de biofilmes determinado pela absorvância (630 nm) extrato de cristal violeta (AECV) das culturas de *E. cloacae* 067 selvagem (■) e transconjugante (■) em meios LB, TYEP, TYEP + 0,25 % $CaCl_2$ e MMS, após incubação a 30 ºC por 24, 48 e 72 horas. A) 24 horas; B) 48 horas e C) 72 horas.

A) 24 horas



B) 48 horas



C) 72 horas

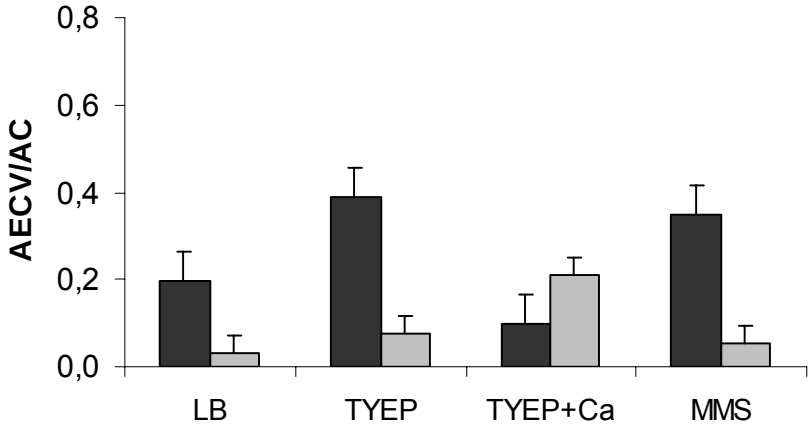


Figura 10 - Potencial de adesão determinado pela razão entre a absorvância do extrato do cristal violeta (AECV) e a absorvância das células (AC) das estirpes de *E. cloacae* 067 selvagem (■) e transconjugante (■) cultivadas em meios LB, TYEP, TYEP + 0,25 % $CaCl_2$ e MMS após incubação a 30 ºC por (A) 24 horas; (B) 48 horas; e (C) 72 horas.

4.6. Formação de biofilme em cupons de aço inoxidável

Após 16 horas de incubação em TYEP e MMS, foi possível a observação de células aderidas de ambas as estirpes de *E. cloacae* aos cupons de aço inoxidável (Figuras 11 e 12). Observação semelhante foi feita por VIANA (2006) com esta mesma estirpe selvagem, após 16 horas de incubação. Essa autora descreveu a presença de multicamadas de células e de aglomerados celulares na superfície de aço inoxidável. A capacidade de *E. cloacae* formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável após 24 horas de contacto também foi evidenciada por FUSTER-VALL *et al*. (2007).

A diferença na contagem de células das estirpes selvagem e transconjugante aderidas nos cupons incubados em TYEP e MMS foi, de aproximadamente um ciclo logarítmico (Figura 13). A diferença no número de células aderidas foi constada também quando da observação dos cupons de aço inoxidável ao microscópio de epifluorescência (Figuras 11 e 12). Células da estirpe selvagem de *E. cloacae* apresentaram maior freqüência de aglomerados com predomínio de multicamadas, independente de meio de cultivo ser o TYEP ou o MMS (Figuras 11 e 12). Esta maior adesão da estirpe selvagem foi observada até 48 horas de incubação e, após este período, não se percebeu diferença significativa entre as estirpes, seja pela observação microscópica dos cupons ou pela contagem de células aderidas.

O fato da estirpe transconjugante, que não acumula AHL, ter apresentado menor adesão e formação de aglomerados celulares menos espessos até 48 horas de incubação é indicativo da regulação da formação de biofilmes pelo sistema *quorum sensing*. A formação de biofilmes é dependente do sistema *quorum sensing* em muitas bactérias. Em *P. aeruginosa* há evidências do papel das AHLs no desenvolvimento dos biofilmes e, mutantes no gene da sintase de AHL *lasI*, responsável pela síntese de 3-oxo-C12-HSL, foram incapazes de formar um biofilme espesso e estruturado, característico do formado pela estirpe parental selvagem (DAVIES *et al*., 1998). O efeito de AHLs na formação de biofilmes por *Nitrosomonas europea* (BATCHELOR *et al*., 1997), por *B. cepacia* (HUBER *et al*., 2001; CONWAY *et al*., 2002; RIEDEL *et al*., 2003) e por *A. hydrophila* foram relatados (LYNCH *et al*., 2002). LYNCH *et al*. (2002) avaliaram a formação de biofilme pela estirpe selvagem e seu mutante, deficiente na produção de C4-HSL, e verificaram que a estirpe mutante falhou em formar um biofilme maduro, sendo que essa capacidade foi restaurada pela adição de C4-HSL exógena.

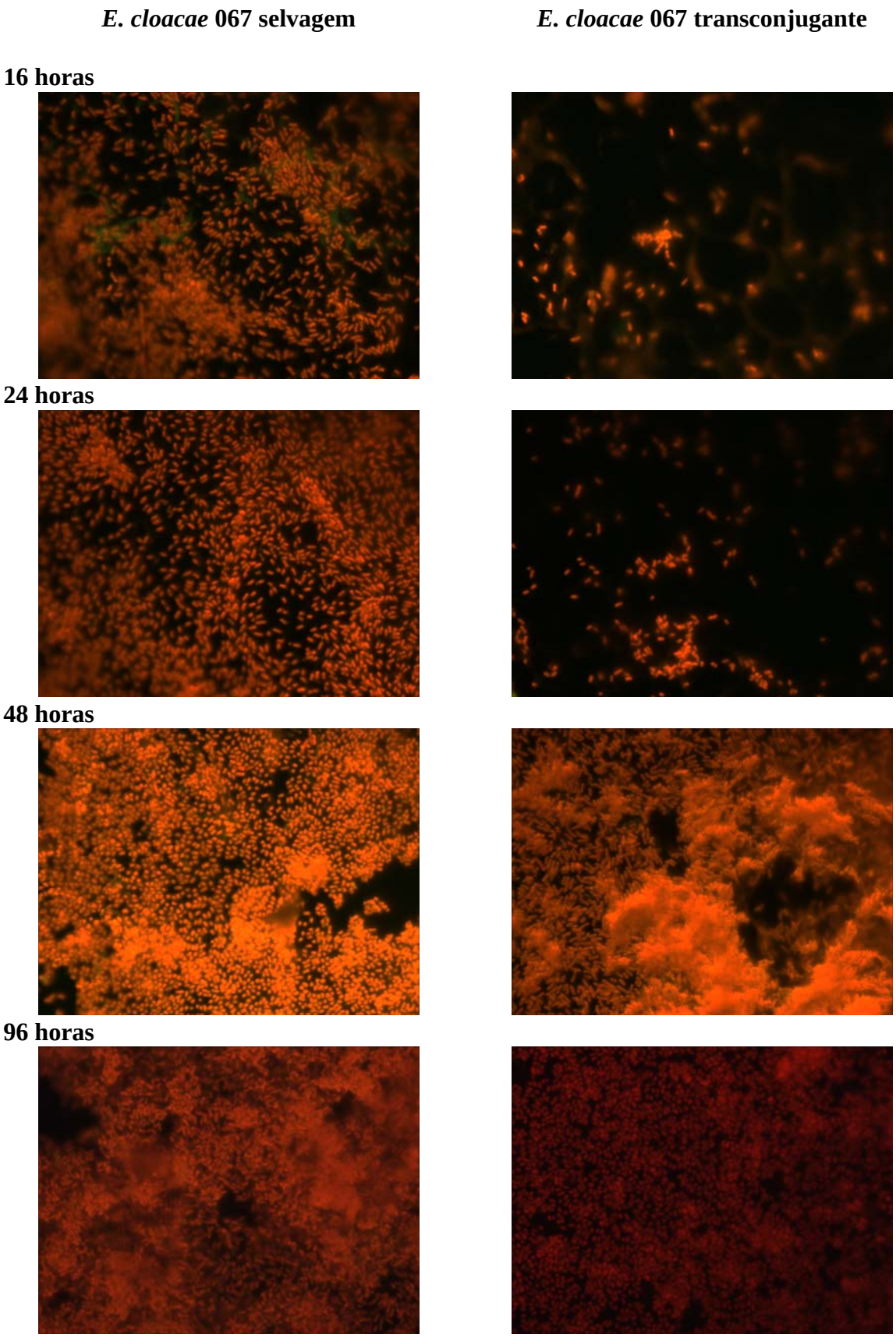


Figura 11 - Micrografias de biofilmes formados por *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante em cupons de aço inoxidável imersos em TYEP, a 30 ºC, no período de 16 a 96 horas de incubação. Aumento de 1000 vezes.

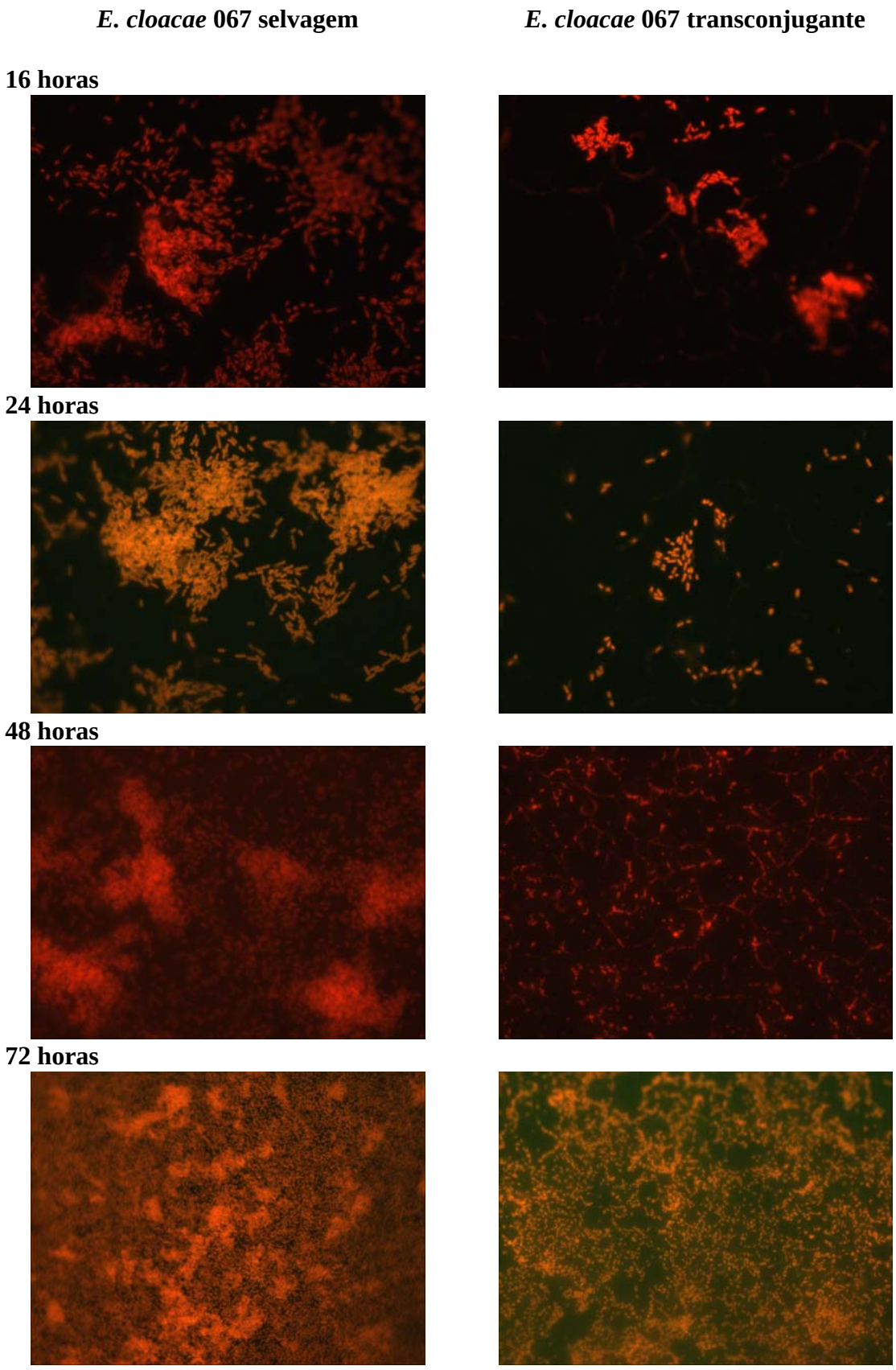


Figura 12 - Micrografias de biofilmes formados por *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante em cupons de aço inoxidável imersos em MMS, a 30 ºC, no período de16 a 72 horas de incubação. Aumento de 1000 vezes.

Deve-se considerar que o transconjugante possui, além da enzima lactonase, gene que codifica resistência a kanamicina, que sempre foi adicionada ao meio para o cultivo dessa estirpe. Não se sabe o efeito do antibiótico kanamicina na formação de biofilmes de *E. cloacae*. Em *Staphylococcus epidermidis*, concentrações subinibitórias dos antibióticos tetraciclina e estreptogramina semi-sintética aumentaram em até 11 vezes a expressão de *ica*, gene responsável pela codificação de uma adesina intercelular importante na formação de biofilmes, enquanto penicilina, oxacilina, cloranfenicol, clindamicina, gentamicina, ofloxacina e vancomicina não tiveram efeito na expressão de *ica* (RACHID *et al*., 2000). Em *P. aeruginosa*, a presença do antibiotico azitromicina ocasionou um retardamento na formação de biofilmes (GILLIS e IGLEWSKI, 2004). Resultados diferentes apresentados por HOFFMAN *et al*. (2005) indicaram que concentrações subinibitórias de antibióticos aminoglicosídeos induzem a formação de biofilmes por *P. aeruginosa* e *E. coli*.

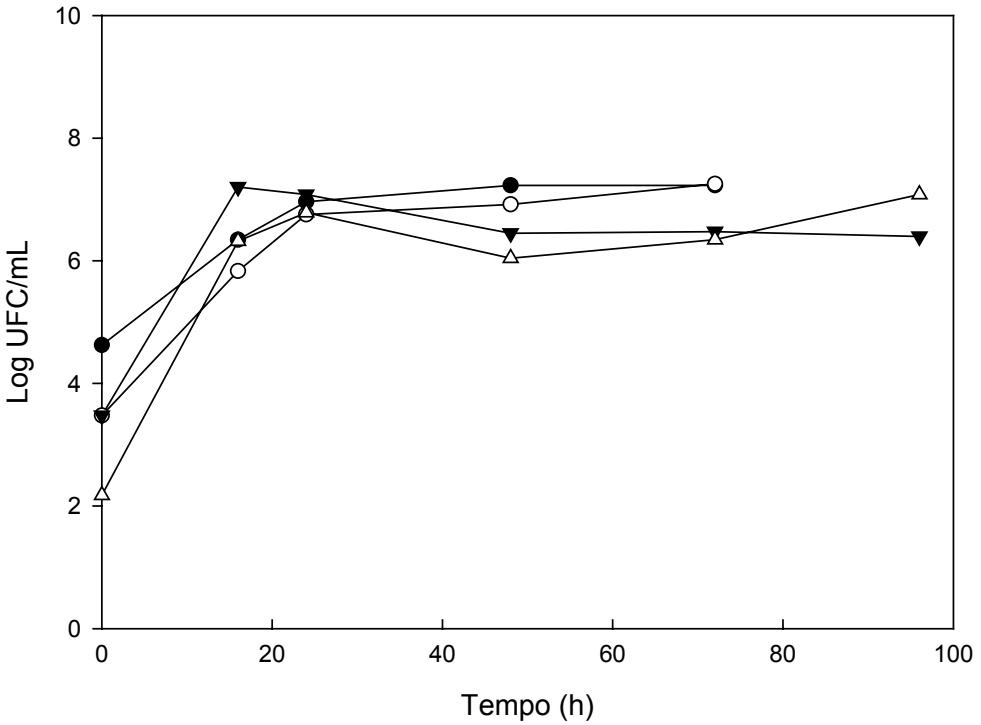


Figura 13 - Logarítmico de UFC . mL^{-1} de células das estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 aderidas a cupons de aço inoxidável, cultivadas em MMS e TYEP a 30 °C por até 96 horas. -●- *E. cloacae* 067 selvagem em MMS; -○- *E. cloacae* 067 transconjugante em MMS; -▼- *E. cloacae* 067 selvagem em TYEP; -Δ- *E. cloacae* 067 transconjugante em TYEP.

4.7. Atividades amilolítica, celulolítica, pectinolítica e lipolítica

As atividades das enzimas hidrolíticas, amilases, celulases e pectinases foram avaliadas, entretanto nem a estirpe selvagem, nem a transconjugante demonstraram atividades dessas enzimas.

A atividade lipolítica em ágar tributirina também não foi verificada em ambas as estirpes de *E. cloacae* 067. Segundo o Manual de Bergey (MURRAY *et al*., 1983), a presença de lipases, verificada pela utilização de óleo de milho, não foi detectada em *E. cloacae*. A atividade lipolítica do sobrenadante da estirpe *E. cloacae* selvagem, cultivada em meios LB e TYEP por 12 horas, também não foi detectada em ρ-nitrofenilpalmitato (MARTINS, 2007).

4.8. Atividade proteolítica

A produção da enzima gelatinase, determinada pela capacidade de liquefazer o meio contendo 12 % de gelatina como agente solidificante, foi constatada na estirpe transconjugante, após 12 dias de incubação a 30 º C (Figura 14). A incapacidade de *E. cloacae* hidrolisar a gelatina está registrado no Manual de Bergey (MURRAY *et al*., 1983) e o resultado obtido sugere que a inibição do sistema *quorum sensing* permite a atividade hidrolítica nesta espécie.

Figura 14 - Hidrólise de gelatina pelas estirpes de *E. cloacae* 067. (**a**) Controle negativo (meio não inoculado); (**b**) *E. cloacae* 067 selvagem; (**c**) *E. cloacae* 067 transconjugante. Os tubos foram colocados a 8 °C após o período de incubação e fotografados na posição horizontal.

A atividade proteolítica em ágar LB suplementado com 2 % de leite desnatado e em ágar caseinato foi verificada em ambas as estirpes avaliadas. Entretanto, *E. cloacae* 067 transconjugante apresentou maior halo de hidrólise da caseína do leite adicionado ao ágar LB (Figura 15). Estes resultados confirmam observações anteriores de MARTINS (2007) que também verificou maior atividade proteolítica da estirpe transconjugante de *E. cloacae* 067. Estes dados sugerem que o sistema *quorum sensing* está envolvido em uma regulação negativa, mas não completa da atividade proteolítica em *E. cloacae* 067. Embora a maioria das proteínas do tipo LuxR atuem como ativadores transcricionais dependentes de AHL, poucos membros dessa família de proteínas atuam como repressores. VON BODMAN *et al*. (1998) sugeriram que a proteína EsaR ativa, similar a proteína LuxR, atue como um repressor transcricional de genes requeridos para a produção de exopolissacarídeos em *Pantoea stewartii,* pois mutação no gene *esaR* levou a hiperprodução de exopolissacarídeos. Em *P. aeruginosa*, uma mutação no gene *rsaL* levou ao aumento drástico na produção de *N*-acil homoserina lactona, destacando a função chave deste regulador negativo no controle do sistema *quorum sensing* (RAMPIONI *et al*., 2006). Acredita-se que RsaL ativa se ligue ao promotor *lasI* impedindo a transcrição da sintase de AHL.

Figura 15 - Atividade proteolítica das culturas de *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante em ágar LB suplementado com 2 % de leite desnatado, incubadas a 30 °C por 48 horas.

4.9. Quantificação da atividade proteolítica e grau de proteólise

Atividade proteolítica não foi detectada no sobrenadante das culturas das estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* em caldo TYEP acrescido de 0,25 % de $CaCl_2$ por até 120 horas de incubação a 30 °C, sob agitação. VIANA (2006) e MARTINS (2007) também não detectaram atividade proteolítica no sobrenadante do meio TYEP inoculado com a estirpe *E. cloacae* 067 selvagem quando foi utilizada azocaseína como substrato. Embora a atividade proteolítica dessa espécie tenha sido confirmada pela hidrólise de caseína em meio sólido, pode-se supor que etapas de preparo da mistura de reação possam interferir com a estabilidade da protease de *E. cloacae* ou ainda, o meio TYEP não seja o ideal para a determinação de atividade proteolítica.

O grau de proteólise do LDR 12 % inoculado com as estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 por 96 horas a 30 °C, sob agitação, aumentou com o tempo de incubação (Figura 16). *E. cloacae* transconjugante sempre apresentou maiores valores de tirosina em relação ao selvagem (Figura 16) e, este resultado reforça a existência de um possível controle negativo da atividade proteolítica pelo sistema *quorum sensing.*

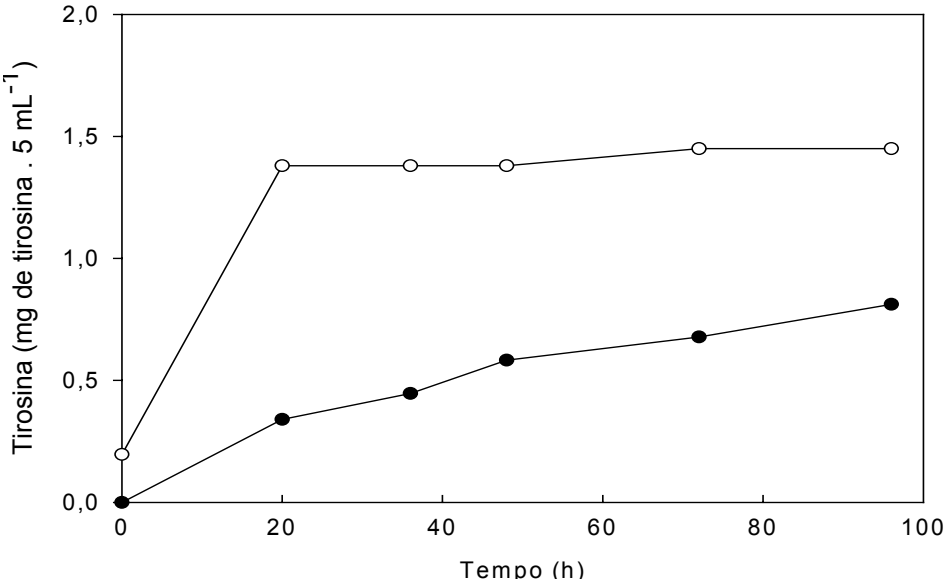


Figura 16 - Grau de proteólise, determinado por mg de tirosina, em LDR 12 % inoculado com estirpe selvagem (-●-) e transconjugante (-○-) de *E. cloacae* 067, e incubados a 30 °C por 96 horas, sob agitação.

4.10. Zimograma

Os sobrenadantes obtidos das culturas selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067, cultivadas em meio TYEP acrescido de 0,25 % de $CaCl_2$ e mantidas a 30 ºC por 96 horas não apresentaram atividade proteolítica detectável em zimograma contendo 2 % de azocaseína. O mesmo resultado foi obtido quando se analisou os sobrenadantes das células cultivadas em meio LDR 12 %, a 30 °C por até 120 horas. A liofilização dos sobrenadantes de culturas das estirpes selvagem e transconjugante, cultivadas no mesmo meio de cultivo, a 30 ºC por 36 horas, com posterior ressuspensão em 50 mM de Tris-HCL pH 8,0, para serem concentrados 15 vezes, não resultou na detecção de tal atividade (Figura 17). Atividade proteolítica nesses concentrados também não foi detectável em ensaios enzimáticos usando azocaseína como substrato. Uma possível explicativa para a não detecção da atividade proteolítica no sobrenadante das culturas é o fato da protease de *E. cloacae* estar ligada a membrana.

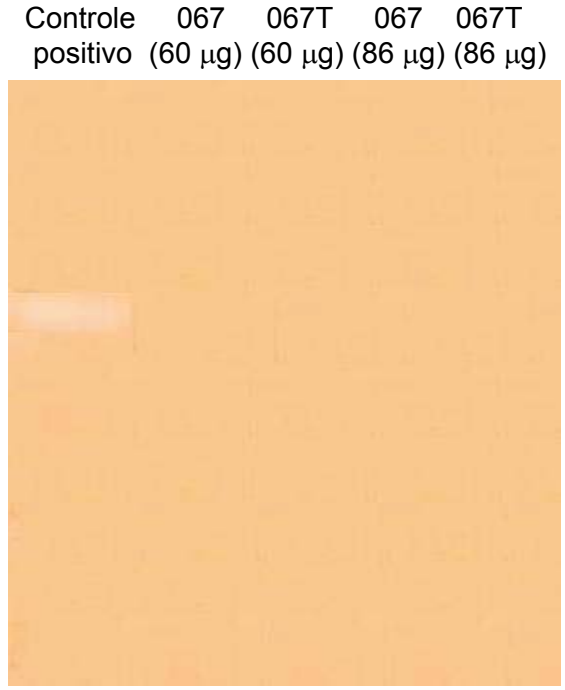


Figura 17 - Zimograma em SDS-PAGE 12 % utilizando como substrato 2 % de azocaseína do extrato livre de células das estirpes selvagem (067) e transconjugante (067 T) de *E. cloacae* 067 concentrado 15 vezes e de *P. fluorescens* 041 (Controle positivo).

Entretanto, a atividade de gelatinase foi observada em sobrenadante da cultura das estirpes selvagem e transconjugante de *E. cloacae* 067 em zimograma utilizando 2 % de gelatina como substrato (Figura 18). Pode-se sugerir que a estirpes selvagem e transconjugante possuem gelatinases diferentes, uma vez que as bandas onde há degradação da gelatina foram observadas com migrações diferentes no gel ou, que por algum motivo, a protease da estirpe selvagem ficou retida no início do gel de separação.

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 transconjugante deve possuir massa molecular de, aproximadamente, 40 a 45 KDa. Há apenas um relato na literatura de proteases de espécies de *Enterobacter*. KOTHARY *et al*. (2007) relataram a presença de uma metaloprotease de, aproximadamente, 38 KDa em uma estirpe de *E. sakazakii*.

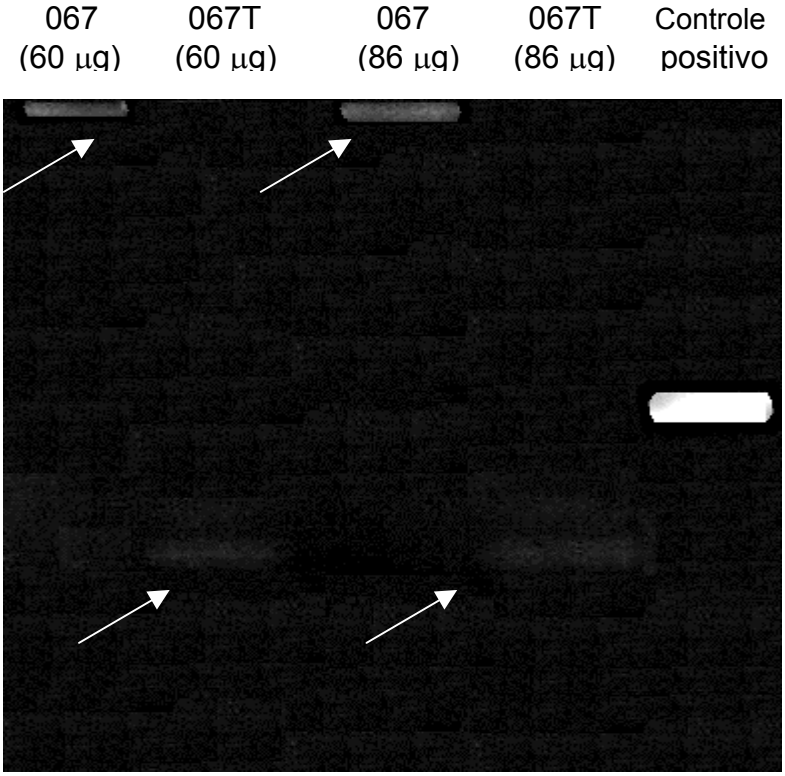


Figura 18 - Zimograma em SDS-PAGE 12 % utilizando como substrato 2 % de gelatina com amostras do extrato livre de células das estirpes selvagem (067) e transconjugante (067 T) de *E. cloacae* 067 concentrado 15 vezes e *P. fluorescens* 041 (Controle positivo).

4.11. Avaliação da atividade proteolítica por coagulação do leite

O leite pausteurizado e o LDR 12 % foram coagulados pela estirpe transconjugante de *E. cloacae* 067, inoculados com população inicial 10^4, 10^6 e 10^7 UFC. mL^{-1}, após 36 horas de incubação a 30 °C sob agitação (Figura 19). Nas mesmas condições de inoculação e incubação, a estirpe selvagem coagulou as amostras de leite pasteurizado e LDR 12 % após 96 horas (Figura 19). Este resultado aumenta as evidências de que o mecanismo de *quorum sensing* regula negativamente a atividade proteolítica em *E. cloacae* 067.

MARTINS (2007) também verificou que a estirpe *E. cloacae* transconjugante foi mais proteolítica em LDR 12% inoculado com 10^4 UFC . mL^{-1} por 18 horas a temperatura ambiente. A alta atividade proteolítica da estirpe transconjugante pode ser atribuída a incapacidade da proteína HalR interferir com a expressão da protease quando está ligada a AHL. Outra possibilidade é a produção de mais de uma protease que não é regulada negativamente por *quorum sensing*. A produção de protease pela estirpe 067 selvagem indica que AHL não reprime completamente HalR de se ligar ao promotor da protease (MARTINS, 2007).

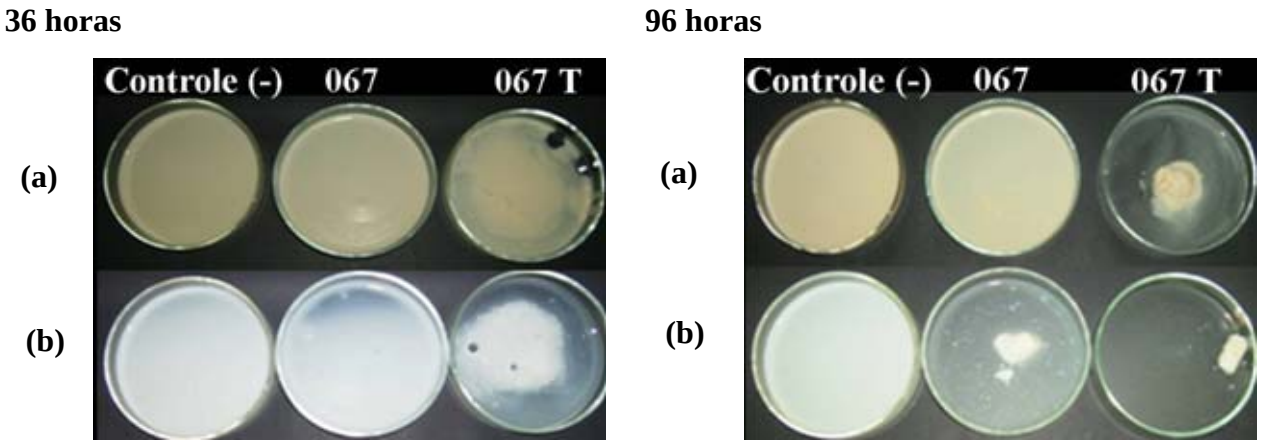


Figura 19 - Coagulação de leite pasteurizado e LDR 12% inoculado com 10^6 UFC. mL^{-1} das estirpes selvagem (067) e transconjugante (067 T) de *E. cloacae* 067, incubados a 30 °C por 96 horas sob agitação.(a) Leite pasteurizado; (b) LDR 12 %.

4.12. Perfil de proteínas extracelulares de *E. cloacae* selvagem e transconjugante

Proteínas extracelulares foram verificadas nos sobrenadantes livres de células, das estirpes selvagem e transconjugante concentrados, 15 vezes (Figura 20).

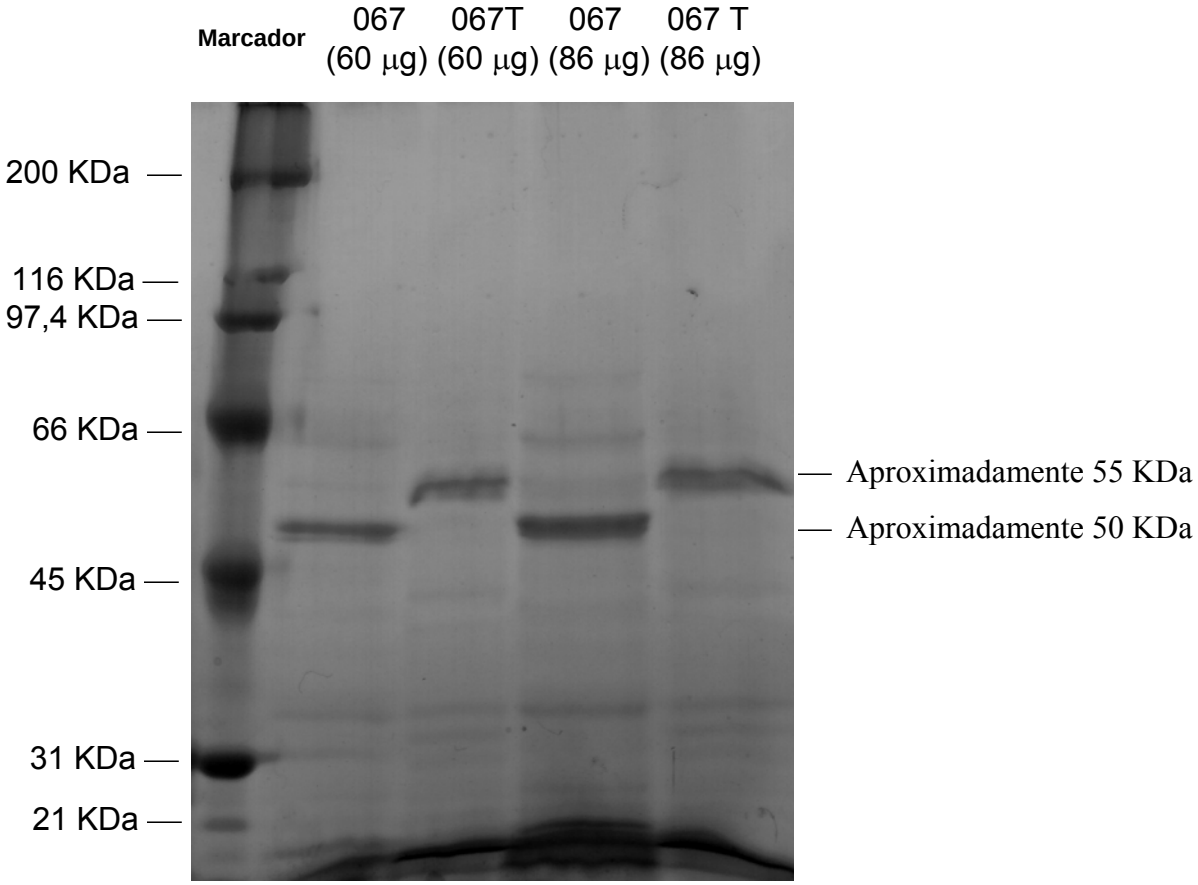


Figura 20 – SDS-PAGE 12 % contendo amostras quantificadas de proteínas do extrato livre de células das estirpes *E. cloacae* selvagem (067) e transconjugante (067T) concentrado 15 vezes.

É possível a observação de diferenças no proteoma extracelular da estirpe selvagem e transconjugante de *E. cloacae*. A diferença no número de bandas observadas em SDS-PAGE no sobrenadante livre de células da estirpe transconjugante de *E. cloacae* 067 sugere que o sistema *quorum sensing* pode estar envolvido na regulação da produção de outras proteínas extracelulares, além da protease. Uma proteína extracelular de massa molecular estimada em 55 KDa foi observada tanto na estirpe selvagem quanto na transconjugante (Figura 20). Esta proteína aparece como uma banda

mais forte na estirpe transconjugante que na estirpe selvagem, indicado que esta seja uma possível protease, uma vez que o transconjugante apresentou maior atividade proteolítica do que a estirpe selvagem. MARTINS (2007) observou a presença de uma proteína de aproximadamente, 50 KDa em extrato protéico livre de células das estirpes selvagem e transconjugante, cultivadas em meio de cultivo TYEP acrescido de 0,25 % de $CaCl_2$ por 16 horas e concentrados quatro vezes. Além dessa proteína de 50 KDa, esse mesmo autor registrou a presença de apenas mais uma proteína correspondente a 16 KDa no sobrenadante de ambas as estirpes e outra de, aproximadamente 20 KDa na estirpe selvagem. O fato de, no presente estudo, ter sido utilizado o sobrenadante concentrado 15 vezes obtido de culturas com 36 horas de incubação pode ser a razão da detecção de maior número de proteínas extracelulares do que observado por MARTINS (2007).

A proteína de massa molecular de, aproximadamente, 50 KDa presente no sobrenadante da cultura da estirpe selvagem e ausente no sobrenadante da cultura transconjugante é mais uma evidência de que o sistema *quorum sensing* regula a síntese de proteínas extracelulares em *E. cloacae* 067 (Figura 20).

5. CONCLUSÕES

A estirpe transconjugante de *E. cloacae* 067, que possui o sistema *quorum sensing* inibido, apresentou velocidade específica de crescimento aumentada a temperaturas acima de 30 ºC em meios nutricionalmente complexos, bem como em meios de constituição mínima. A inibição desse mecanismo de comunicação célula-célula também aumentou a atividade proteolítica da estirpe transconjugante sobre a caseína e gelatina, sugerindo a ocorrência de um sistema de regulação negativa da síntese de enzimas hidrolíticas mediada por AHLs. A adesão celular e etapas da formação de biofilmes por *E. cloacae* 067 também parece estar sobre a regulação do sistema *quorum sensing*, uma vez que a estirpe transconjugante apresentou menor potencial de adesão e de desenvolvimento inicial de biofilmes. Entretanto, fenótipos como presença de motilidade por contração e ausência de motilidade por espalhamento, de hidrólise do amido, celulose, pectina e tributirina não foram alterados na estirpe transconjugante. A diferença entre o número de proteínas no sobrenadante livre de células de *E. cloacae* 067 transconjugante e selvagem sugere que o sistema *quorum sensing* pode estar envolvido na regulação de outras proteínas extracelulares, além da proteases.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainsless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 16, p. 833-887, 1998.

ATKINSON, S., CHANG, C. I., SOCKETT, E., CÁMARA, M., WILLIAMS, P. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1451–1461, 2006.

BARREIRA, E. R., SOUZA, D. C., GÓIS, P. F., FERNANDES, J. C. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria**, v. 25, p. 65-70, 2003.

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

BRUHN, J. B.; CHRISTENSEN, A. B.; FLODGAARD, L. R.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T.; GIVSKOV, M.; GRAM, L. Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.4293-4302, 2004.

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.

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

CLARK, D. J. E MAALØE, O. DNA replication and the division cycle *Escherichia coli*. **Journal Molecular Biolology**, n.23, p.99–112, 1967.

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

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

DEFOIRDT, T.; BOON, N.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. **Aquaculture**. v. 240, p. 69-88, 2004.

DEGRASSI, G.; AGUILAR, C.; BOSCO, M.; ZAHARIEV, S.; PONGOR, S.; VENTURI, V. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS 358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial 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.

DONG, Y. H.; WANG, L. H.; XU, J. L.; ZHANG, H. B.; ZHANG, X. F.; ZHANG, L. H. Quenching quorum sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. **Nature**, v. 411, p.813-817, 2001.

DONG, Y. H; GUSTI, A. R; ZHANG, Q.; XU, J. L; ZHANG, L. H. Identification of quorum-quenching *n*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, p. 1754–1759, 2002.

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

DONG, Y. H E ZHANG, L. H. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 101-109, 2005.

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

EBERL L.; WINSON, M. K., STERNBERG, C., STEWART, S. A. B., CHRISTIANSEN, G., CHHABRA, S. R., BYCROFT, B., WILLIAM, P., MOLIN, S., GIVSKOV, M. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens.* **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 1, p.127-136, 1996.

EBERL, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG 1. **Journal of Bacteriology**, v.181, n. 6, p. 1703–1712, 1999.

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

FARMER, J. J., ASBURY, M. A., HICKMAN, F. W., & BRENNER, D. J. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 569–584, 1980.

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.

FLETCHER, M. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 2027-2030, 1988.

FLODGAARD, L. R., CHRISTENSEN, A. B., MOLIN, S., GIVSKOV, M., GRAM, L. Influence of food preservation parameters and associated microbiota on production rate, profile and stability of acylated homoserine lactones from food-derived *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p.145-156, 2003.

FUSTER-VALLS, N., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., MARÍN-DE-MATEO, M., RODRÍGUES-JEREZ, J. Effect of different environmental condictions on the bacterial survival on stainless steel surfaces. **Food Control**. **In Press**, 2007.

FUQUA, C, GREENBERG, E. P., Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signaling. **Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 685-695, 2002.

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.

GILLIS, R. J., IGLEWSKI, B. H. Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5842–5845, 2004.

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

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

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J. B.; CHRISTENSEN, A.B.; GIVSKOV, M. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.79-97, 2002.

HAAS, M. J. Lipolytic microrganisms. In: DOWNES,F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. APHA, cap.15, p. 175 - 181, 2001.

HANKIN, L., ZUCKER, M., SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**. v. 22, n. 02, p.205-209, 1971.

HOFFMAN, L. R., D'ARGENIO, D. A., MACCOSS, M. J., ZHANG, Z., JONES, R. A., MILLER, S. I. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Nature**, v. 436, n. 25, p. 1171-1175, 2005.

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.

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

HULL, M. E. Studies on milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 30, p. 881-894, 1947.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 348-350.

JONES, S., YU, B., BAINTON, N. J., BIRDSALL, M., BYCROFT, B.W., CHHABRA, S.R., COX, A.J.R, GOLBY, P., REEVES, P.J., STEPHENS, S., WINSON, M.K., SALMOND, G.P.C., STEWART, G.S.A.B, WILLIAMS, P. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia*

carotovora and *Pseudomonas aeruginosa*. **The European Molecular Biology Organization Journal,** v. 12, n. 6, p. 2477-2482, 1993.

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.

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

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

KIM, K. Y., FRANK, J. F. Effect of growth nutrients on attachament of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 8, p. 720-724, 1994.

KOTHARY, M. H., McCARDELL, B. A., FRAZAR, C. D., DEER, D., TALL, B.D. Characterization of the zinc-Containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4142–4151, 2007

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.

LAZAZZERA, B.A. The intracellular function of extracellular signaling peptides. **Peptides**, v. 22, p. 1519-1527, 2001.

LEHNER, A., RIEDEL, K., EBERL, L., BREEUWER, P., DIEP, B., STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strain: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2287-2294, 2005.

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.

LEADBETTER, J. R., GREENBERG, E. P. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by *Variovorax paradoxus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 6921-6926, 2000.

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

LINDBERG, A. M., LJUNGH, A.; AHRNÉ S.; LOFDAHL, S.; MOLIN, G. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 11–17, 1998.

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

MARCH, J. C.; BENTLEY, W. E. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 495–502, 2004.

MARCY, J. A., PRUETT, W. P. Proteolytic microorganisms. In: DOWNES,F.P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. APHA, cap. 7, p. 63-67, 2001.

MARTINS, M. L. **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e *quorum sensing* em bactérias psicrotróficas isoladas de leite.** 171p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MEDINA-MARTÍNEZ, M. S., UYTTENDAELE, M., DEMOLDER, V., DEBEVERE, J. Effect of temperature and glucose concentration on the N-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*. **Food Microbiology**, v. 23, p. 534-540, 2006.

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

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.

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.

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 Sistematic Bacteriology**, v. 1, p. 465-469, 1983.

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.

PARSEK, M. R., VAL, D. L., HANZELKA, B.L., CRONAN, J. R., GRENBERG, E.P. Acyl homoserine-lactone quorum sensing signal generation. **Proceedings National Academy of Science of USA**., v. 96, p. 4360-4365, 1999.

PARSEK, E. C., GREENBERG, E. P.Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97,n. 16, p. 8789-8793, 2000.

PESCI, E. C.; MILBANK, J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KEDE, A. S.; GREENBERG, E. P.; IGWLEWSKI, B. H. Quinolona 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.

PILLAI, S. D. e JESUDHASAN, P. R. Quorum sensing: how bacteria communicate. **Food Technology**, p. 42-50, 2006.

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

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

PINTO, U. M., VIANA, E. S., MARTINS, M. L., VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, v. 18, p. 1322-1327, 2007.

RACHID, S., OHLSEN, K., WITTE, W., HACKER, J., ZIEBUHR , W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3357–3363, 2000.

RAMPIONI, G., BERTANI, I., ZENNARO, E., POLICELLI, F., VENTURI, V., LEONI, L. The quorum-sensing negative regulator *rsal* of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 188 , p. 815–819, 2006.

RASCH, M., ANDERSEN, J. B., NIELSEN, K. F., FLODGAARD, L. R., CHRISTENSEN, H., GIVSKOV, M., GRAM, L. Involvement of bacterial quorum sensing signals in spoilage of bean sprouts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3321-3330, 2005.

RASMUSSEN, T. B., MANEFIELD, M., ANDERSEN, J. B., EBERL, L., ANTHONI, U., CHRISTOPHERSEN, C., STEINBERG, P., KJELLEBERG, S., GIVSKOV, M. How *Delisea pulcha* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG 1. **Microbiology**, n. 146, p. 3237-3244, 2000.

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

RIEDEL, K.; TALKER-HUIBER, D.; GIVSKOV, M.; SCHWAB, H.; EBERL, L. Identification and caracterization of a GDLS esterase gene located proximal to the *swr* quorum sensing system of *Serratia liquefaciens* MG1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.07, p. 3901-3910, 2003.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.

SPERANDIO, V., TORRES, A. G., JARVIS, B., NATARO, J. P., AND KAPER, J. B. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 100, n. 15, 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*-acylhomoserine 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.

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.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia.** 8 ed, Porto Alegre : Artemed, 2005, p. 313-315.

ULRICH, R. L. Quorum quenchining: enzymatic disruption of n-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkolderia thailandensis*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 70, p. 6173-6180, 2004.

VIANA, E. S. **Detecção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite**. 159 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

VON BODMAN, S. B., MAJERCZAK, D. R., COPLIN, D. L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* sbsp. *stewartii*. **Proceedings of the National Academy Science of USA**, v. 95, p. 7687-7692, 1998.

WANG, L. H., WENG, L. X., DONG, Y. H., ZHANG, L. H. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactone (AHL-lactonase). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 14, p. 13645-13651, 2004.

WATERS, C. E BASSLER, B. L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 24, p. 319-346, 2005.

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.

ZHANG, L. H. E DONG, Y. H. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 1563-1571, 2004.

ZHU, J.; MILLER, M. B.; VANCE, R. E.; DZIEJMAN, M.; BASSLER, B. L.; MEKALANOS, J. J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 99, n. 5, p. 3129-3134, 2002.