UELINTON MANOEL PINTO

Quorum sensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UELINTON MANOEL PINTO

Quorum sensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite

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

APROVADA: 29 de abril de 2005

Profª. Elza Fernandes Araújo
(Conselheira)

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Conselheiro)

Prof. Marcos Rogério Tótola

Drª. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Profª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Às minhas quatro pilastras:

Deus

Família

Igreja

Amigos

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, porque tem me dadas condições de realizar meus projetos, sustentado os meus passos, concedendo vitórias que por mim mesmo jamais alcançaria e pelo seu amor incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela excelente formação e oportunidades concedidas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti por todos os ensinamentos, profissionalismo, pelos quatro anos de orientação, entusiasmo, excelente convivência e amizade;

Ao Professor Hilário Cuquetto Mantovani pelas preciosas sugestões que muito ajudaram no decorrer do estudo, pelo entusiasmo e disponibilidade;

À Professora Elza Fernandes Araújo pelas sugestões e entusiasmo;

À Doutora Virgínia Maria Chaves Alves pelas sugestões e incentivo;

À Professora Célia Alencar pelo entusiasmo e preciosas sugestões quanto ao doutorado nos Estados Unidos;

Ao Professor Arnaldo Chaer Borges pela ajuda na aquisição das estirpes monitoras doadas pela Universidade de Nottingham;

Ao Professor Marcos Rogério Tótola pela participação na banca de defesa;

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia que de uma forma ou de outra contribuíram para conclusão deste trabalho e participaram da minha formação;

À Doutora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG pelas sugestões, apoio contínuo e, especialmente, pela amizade;

A todos os meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Anaeróbios, especialmente: Bete, Janaína, Flávia, Renata, Eliane, Maurílio, Bruno, Ana Diolina, Marcelo, Rodrigo, Marília, Adriana Leandro, Adriana dos Reis, Carol, Selma, Simone, Rafael, dentre outros, pela ótima convivência, amizade, brincadeiras, boa vontade e apoio constantes;

A Esther e Eliseth pela ajuda, pela amizade e ótima convivência;

A Tássia e Fernanda pela ajuda e amizade;

Aos meus amigos do BioAgro, especialmente o pessoal do Laboratório de Microbiologia Industrial, Fisiologia, Genética de Microrganismos e Petróleo que estiveram sempre prontos a me ajudar, dividir os equipamentos e o laboratório;

À melhor turma do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MBI 631) representada pela Joesse, Renata e Natália especialmente pela amizade e convivência;

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e do BioAgro, especialmente o Cesário, Sr. Paulo, José Carlos, Pablo e Danilo;

A Aparecida, Laura e Nilcéia pelo auxílio constante e exemplo de profissionalismo público;

Aos meus amigos da "Maranatha Boys®": Daniel, Edgar, Eduardo, Isaque e Marcelo (extensivo aos agregados, especialmente Gabriela e Luziane) pelas brincadeiras, força e principalmente pela amizade;

A todos os meus familiares (Meu pai João, *in memorian*, minha mãe Marilda, meus irmãos: Odaléia, Cleide, Vail e Tatiane, meus sobrinhos Camila e Levi, aos cunhados: Suemy, Bilfar e a amiga Bubu) pelos estímulos, ajuda, compreensão e dedicação constantes;

A todos os meus amigos que estiveram sempre ao meu lado dispostos a me ajudar (especialmente a turma da igreja, o pessoal dos alojamentos 2331 e 2332);

Ao Professor Stephen C. Winans da Universidade de Cornell (EUA) pela doação das culturas monitoras de *Agrobacterium tumefaciens* A136, WCF47, KYC55 e pelas sugestões que foram extremamente úteis na realização deste trabalho;

Ao Professor Paul Williams da Universidade de Nottingham (Reino Unido) pela doação da cultura de *Chromobacterium violaceum* CV026 e do plasmídeo pSB403;

A todas as pessoas que ajudaram na minha trajetória acadêmica, desde o ensino fundamental até a presente data, pois, de uma forma ou de outra, tiveram participação nas minhas conquistas.

BIOGRAFIA

UELINTON MANOEL PINTO, filho de João Alves Pinto e Marilda Duque Pinto, nasceu em Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, em 16 de Abril de 1979.

Graduou-se em Engenharia de Alimentos em Março de 2003 pela Universidade Federal de Viçosa, quando iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola.

Foi aceito para realização do doutorado pleno na Universidade de Cornell (EUA) pelo programa Capes-Fulbright a iniciar-se em agosto de 2005.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS ix

LISTA DE FIGURAS x

LISTA DE ABREVIAÇÕES xii

EXTRATO xiii

ABSTRACT xv

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1. Microrganismos psicrotróficos em leite e suas implicações 3

2.2. *Quorum sensing* 6

2.3. *Quorum sensing* em outros microrganismos 16

2.4. Métodos de detecção de AHL 19

2.5. *Quorum sensing* – Como controlar a comunicação entre células? 20

2.6. *Quorum sensing* em bactérias deterioradoras de alimentos 21

3. MATERIAL E MÉTODOS 24

3.1. Condições de Cultivo dos Microrganismos e Estocagem de Culturas 24

3.2. Transformação de *E. coli* DH5α com o plasmídeo pSB403 25
3.3. Detecção de microrganismos produtores de AHL em meio sólido e líquido.... 26
3.4. Extração de AHL 28
3.5. Determinação da produção de AHL por *P. fluorescens* 07A em meio líquido. 29
3.6. Crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo 31
3.7. Determinação da atividade proteolítica 31
3.8. Determinação do pH e fluorescência dos meios após crescimento celular 32
3.9. Determinação do consumo de glicose 32
3.10. Efeito da adição de ABL e HHL no crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A 32
3.11. Efeito da adição de extrato de AHL, obtido de *P. fluorescens* 07A, sobre a atividade proteolítica da cultura em TYEP + $CaCl_2$..... 33

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34

4.1. Detecção de microrganismos produtores de AHL em meio sólido e líquido.... 34
4.2. Extração de AHL 37
4.3. Produção de AHL por *P. fluorescens* 07A em MMS e TYEP + $CaCl_2$ 42
4.4. Crescimento e atividade proteolítica do isolado *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo 45
4.5. Determinação do pH e fluorescência dos meios..... 50
4.6. Efeito da adição de ABL e HHL no crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A 52
4.7. Efeito da adição de extrato de AHL(s) sobre a atividade proteolítica em TYEP + $CaCl_2$ 53

5. RESUMO E CONCLUSÕES 56

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 58

ANEXO 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Regulação de fenótipos bacterianos por *quorum sensing* via sinalização por homoserina lactona acilada em algumas bactérias Gram-negativas. 11

Tabela 2 - Fatores de virulência regulados por *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*..... 16

Tabela 3 - Bactérias produtoras de AHL. 35

Tabela 4 - Porcentagem de isolados positivos em cada sistema monitor e porcentagem total (isolados psicrotróficos + estirpes ATCC) de estirpes produtoras de AHL. 37

Tabela 5 - Indução da produção de β-Gal em *A. tumefaciens* KYC55 em ágar AT por extratos de *P. fluorescens* 07A obtidos em caldo LB por 14 e 18 h de incubação.. 42

Tabela 6 - Valores de pH dos meios de cultura no início (0 h) e após o crescimento de *P. fluorescens* 07A por 80 h de incubação a 22 ºC e 150 RPM..... 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cadeias de homoserinas lactonas aciladas. 10
Figura 2 - A lula *E. scolopes*, um dos hospedeiros da bactéria *V. fisheri*..... 12
Figura 3 - O sistema LuxI/LuxR da bactéria Gram negativa *V. fisheri*. 14
Figura 4 - A seqüência de nucleotídeos do box *lux* de *V. fisheri* MJ1 e uma seqüência consenso para elementos tipo box *lux* encontrados em regiões promotoras de genes regulados por homólogos de LuxR. 19
Figura 6 - Plasmídeo pSB403.. 26
Figura 7 - Sistemas de detecção de bactérias produtoras de AHL..... 38
Figura 8 - Bioensaio em placa, utilizando a estirpe C. violaceum CV026, para detecção de AHL nos extratos das culturas de *S. liquefaciens* 016 e *P. fluorescens* 07A..... 39
Figura 9 - Bioensaio para detecção de AHL em sobrenadante da cultura de P. fluorescens 07A..... 40
Figura 10 - Produção de AHL em MMS. 43
Figura 11 - Produção de AHL em TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. 44
Figura 12 - Crescimento e atividade proteolítica de P. fluorescens 07A em diferentes meios de cultivo. 46
Figura 13 - Consumo de glicose durante o crescimento de *P. fluorescens* 07A em TYEP + glicose 0,5 %, a 22 ºC, sob agitação de 150 RPM. 47

Figura 14 - Atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo e sua relação com a densidade populacional..... 51
Figura 16 - Efeito da adição de ABL e HHL sobre o crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A.. 52
Figura 17 - Efeito da adição do extrato de AHL sobre a atividade proteolítica específica de *P. fluorescens* 07A em TYEP $CaCl_2$ durante 10 h de incubação a 22ºC, sob agitação de 150 RPM.. 54

LISTA DE ABREVIAÇÕES

β-Gal – β-Galactosidase

ABL – α-amino-butiro lactona

AHL – Homoserina lactona acilada

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

DKP – Dicetopiperazina

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

LB – Meio Luria Bertani

LDR 12% – Leite desnatado reconstituído 12%

MMS – Meio mínimo de sais

OHHL – N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL)

OOHL – N-3-oxooctanoil-L-homoserina lactona (3-hidroxi-C8-HSL)

ONPG – o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo

PAI1 – N-3-oxododecanoil-hoserina lactona (3-oxo-C12-AHL ou OdDHL)

PAI2 – N-butanoil-L-homoserina lactona (C4-AHL ou BHL)

SQP – Sinal quinolona de *Pseudomonas*

TYEP – Meio triptona, extrato de levedura e fosfato

UFC mL^{-1} – Unidades formadoras de colônias por mililitro

UM – Unidades Miller

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

EXTRATO

PINTO, Uelinton Manoel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2005. ***Quorum sensing* em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Hilário Cuquetto Mantovani.

Por meio de um mecanismo denominado *quorum sensing*, diversas bactérias podem comunicar-se umas com as outras e coordenar a expressão gênica de acordo com a densidade populacional de forma semelhante aos organismos multicelulares. Este trabalho teve como objetivo investigar a produção de moléculas sinalizadoras de quorum, conhecidas como homoserinas lactonas aciladas (AHLs), por bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado. Verificou-se também se a atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* 07A é dependente da densidade populacional. Foram avaliados 53 isolados psicrotróficos proteolíticos e sete estirpes ATCC quanto à produção de AHL em meio sólido utilizando as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Chromobacterium violaceum* CV026 e *Escherichia coli* pSB403 como sistemas monitores ou sensores da presença de AHL. A produção de moléculas sinalizadoras foi freqüente entre os isolados psicrotróficos proteolíticos, constatando-se que, aproximadamente, 89 % das estirpes avaliadas foram produtoras de AHL. A extração de moléculas autoindutoras foi realizada em dois isolados, *Serratia liquefaciens* 016 e *P. fluorescens* 07A e, a presença de AHL nos extratos foi confirmada pelas estirpes monitoras *C. violaceum* CV026 e *A. tumefaciens* KYC55, respectivamente. A produção de AHL pelo isolado *P. fluorescens* 07A foi determinada

em meio de cultivo à base de triptona suplementado com 0,25 % de cálcio (TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %) e em meio de constituição mínima (MMS), utilizando a estirpe monitora *A. tumefaciens* KYC55. Em meio TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % a produção de AHL(s) alcançou o máximo ao final da fase logarítmica, quando a população de *P. fluorescens* 07A foi da ordem de 10^9 UFC mL^{-1}. Esta mesma população resultou em uma concentração de AHL(s) cerca de três vezes menor no MMS. Os resultados indicaram que a produção de AHL pode estar sob controle de autoindução. O crescimento e a atividade proteolítica do isolado 07A foram avaliados em seis meios de cultivo. Não foi observada diferença no crescimento do isolado nos diferentes meios, exceto no MMS, onde a estirpe cresceu de forma mais lenta. Entretanto, a produção de proteases foi maior em meio TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % e em leite desnatado reconstituído (LDR 12 %). A detecção da atividade proteolítica só foi possível quando a cultura atingiu concentração populacional elevada em todos os meios avaliados, excetuando-se no meio MMS, quando a atividade proteolítica foi detectada em uma densidade populacional 10 vezes menor. Nos meios a base de triptona o pH aumentou para valores próximos a 8,5. Meios contendo íons Ca^{+2} apresentaram grande fluorescência ao final do período de incubação, indicando maior produção do sideróforo pioverdina. A adição de duas AHLs sintéticas não afetou o crescimento e a atividade proteolítica da estirpe *P. fluorescens* 07A em meio TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. Quando comparada ao controle, a atividade proteolítica específica de *P. fluorescens* 07A não foi afetada significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pela suplementação do meio TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % com extrato de AHL obtido da própria estirpe. O *quorum sensing* pode não estar regulando a atividade proteolítica em *P. fluorescens* 07A.

ABSTRACT

PINTO, Uelinton Manoel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, april 2005. ***Quorum sensing* in psychrotrophic proteolytic bacteria isolated from milk.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Commitee Members: Elza Fernandes de Araújo and Hilário Cuquetto Mantovani.

In a process called quorum sensing, a range of bacterial cells communicate and coordinate the expression of multiple phenotypes according to cell density. This work aimed to evaluate the production of signaling molecules known as N-acyl homoserine lactone (AHL) by psychrotrophic proteolytic bacteria isolated from raw milk as well as to verify if the proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* 07A is under the control of quorum sensing. Fifty three psychrotrophic isolates and seven ATCC cultures were screened for the production of AHL in agar systems using the monitor strains *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Escherichia coli* pSB403. It was verified that almost 89 % of the psychrotrophic isolates tested elicited a positive response in at least one of the monitor strains of AHL. Signaling molecules were extracted from *Serratia liquefaciens* 016 and *P. fluorescens* 07A and the presence of AHL was detected with the monitor strains *C. violaceum* CV026 and *A. tumefaciens* KYC55, respectively. The production of AHL by the strain 07A was evaluated in a complex medium (TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %) and a defined medium (MMS). *A. tumefaciens* KYC55 was used to quantify AHL in this assay. In TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % the AHL concentration reached a maximum value at the end of

the stationary phase, when the population of *P. fluorescens* 07A was 10^9 CFU mL^{-1}. When MMS medium was used, a similar cell population was achieved, but the AHL concentration was three fold lower. The results indicated that AHL production by *P. fluorescens* 07A could be regulated by autoinduction. The growth and proteolytic activity of the *P. fluorescens* 07A were monitored in six different media. It was not observed difference in the specific growth rate of the strain in the media tested, except in MMS, where it grew slower. On the other hand, the protease activity was higher in the complex medium (TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %) and reconstituted skimmed milk (LDR 12 %). Proteolytic activity was only detected when the culture reached high population densities (10^8 UFC mL^{-1}) in all media evaluated. In MMS, proteolytic activity was detected at lower population densities (10^7 UFC ml^{-1}). An increase in pH values was observed during cultivation in media containing tryptone. The emission of fluorescence was intensified in media containing calcium. The addition of two synthetic AHLs did not affect the growth rates and the proteolytic activity of the strain 07A in TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. Furthermore, the addition of AHL extracted from the culture did not increase the specific proteolytic activity in TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. These results indicate that quorum sensing may not have a direct role in the regulation of protease production in *P. fluorescens* 07A.

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa sobre *quorum sensing* em microrganismos começou no final da década de 60. Inicialmente foi observado que a bactéria bioluminescente *Vibrio fisheri* produzia luz somente quando uma densidade populacional alta estava presente. Por volta de 1981, a molécula sinalizadora foi isolada e identificada como sendo uma homoserina lactona acilada e a análise dos genes envolvidos foi feita em seguida, o que levou ao desenvolvimento de um modelo que é hoje o paradigma para sistemas de *quorum sensing* similares. Porém, o estudo em comunicação célula-célula ficou limitado às bactérias bioluminescentes *V. fisheri* e *V. harvyei* por vários anos até que, na década de 90, se descobriu que o sistema era mais comum do que se imaginava.

Atualmente, muitos estudos sobre *quorum sensing* estão direcionados para a elucidação de mecanismos de interação entre procariotos e eucariotos, fatores de virulência de patógenos de plantas e animais, otimização da capacidade das células em se diferenciar em formas mais bem adaptadas a ambientes hostis, produção de antibióticos e, recentemente, alguns trabalhos têm avaliado a relação do *quorum sensing* com a deterioração de alimentos. Apesar disso, ainda existem poucos estudos que evidenciam a função da comunicação célula-célula entre bactérias e sua importância para a microbiologia de alimentos, tanto no aspecto dos microrganismos deterioradores, quanto dos patogênicos.

Várias bactérias isoladas de alimentos, incluindo membros da família Enterobacteriaceae, e espécies do gênero *Pseudomonas* já foram identificadas como

produtoras de moléculas sinalizadoras. Existem evidências que sugerem um possível envolvimento da comunicação célula-célula na ativação da produção de enzimas hidrolíticas, como proteases. Porém, além da confirmação deste evento, ainda faltam informações sobre os mecanismos de regulação da produção de proteases em microrganismos isolados de alimentos e quais estratégias a serem adotadas para um controle efetivo desta produção.

O conhecimento sobre o mecanismo de comunicação célula-célula e a sua relação com a deterioração de alimentos irá fornecer informações valiosas sobre a ecologia microbiana de produtos alimentícios, podendo trazer benefícios para a ciência e indústria com o desenvolvimento de novas técnicas de preservação e aumento da vida útil destes produtos.

Buscando obter maiores informações sobre a importância do sistema *quorum sensing* em microrganismos provenientes de alimentos e o esclarecimento dos aspectos que regulam a produção de enzimas hidrolíticas por psicrotróficos proteolíticos, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a produção de moléculas sinalizadoras (AHL) em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado, verificar a produção de AHL em meios de cultivo líquido e a relação entre a produção de proteases termorresistentes por *Pseudomonas fluorescens* 07A com o mecanismo *quorum sensing*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos psicrotróficos em leite e suas implicações

A biodeterioração de alimentos é um processo complexo e quantidades expressivas de alimentos são perdidas em razão da atividade microbiana, mesmo com as técnicas modernas de preservação utilizadas (Gram et al., 2002). O leite, pelas suas características intrínsecas como atividade de água elevada, pH próximo ao neutro e grande variedade de nutrientes disponíveis, é um meio de cultura ideal para muitos microrganismos (Frank, 1997). As bactérias podem ter acesso ao leite e aos produtos lácteos por várias fontes, de modo que a determinação das causas de altas contagens bacterianas nestes produtos não é tarefa fácil (Murphy & Boor, 2000).

A função da estocagem do leite à temperatura de refrigeração é reduzir a taxa de crescimento bacteriano, mas esta prática não impede que microrganismos psicrotróficos continuem a se multiplicar (Law, 1979; Cousin, 1982; Enetoth, Ahrné e Molin, 2000) e mudanças relativas no número de bactérias podem afetar, drasticamente, a ecologia microbiana do leite cru (Murphy & Boor, 2000). As bactérias psicrotróficas são ubiquitárias, sendo encontradas principalmente no solo, na água, nas plantas e nos animais (Cousin, 1982). Estes microrganismos tornaram-se um problema sério para a indústria de laticínios após a adoção da estocagem refrigerada do leite cru na fonte de produção, a diminuição da freqüência de coleta do produto e sua posterior estocagem na indústria (Cousin, 1982). Segundo Murphy & Boor (2000), quanto maior o tempo de

armazenamento do leite cru antes do processamento, maiores serão as chances da população de psicrotróficos aumentar.

A pasteurização e outros tratamentos aplicados ao leite inativam ou removem os microrganismos, porém cerca de 50 % do leite envasado, após a estocagem prolongada a baixas temperaturas, pode estar contaminado com números elevados de bactérias Gram-negativas (Eneroth et al., 1998). A qualidade dos produtos lácteos pode ser afetada pela atividade de enzimas termorresistentes, como proteases e lipases extracelulares, produzidas por psicrotróficos antes e após o processamento térmico (Frank, 1997; Sørhaug e Stepaniak, 1997). A detecção e o controle de psicrotróficos e suas enzimas resistentes ao calor são de grande interesse para o trabalho de controle de qualidade na indústria de produtos lácteos (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

Os microrganismos psicrotróficos crescem em leite a temperaturas próximas a 0 ºC e são representados, principalmente, por bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp e por bactérias Gram-positivas como *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Micrococcus* spp (Cousin, 1982; Sørhaug e Stepaniak, 1991; Shah, 1994; Pinto 2004). Martins (2003) constatou uma grande diversidade entre isolados bacterianos psicrotróficos provenientes de leite. Entre estes contaminantes, os de maior relevância para a indústria laticinista são as espécies do gênero *Pseudomonas* (Frank, 1997). Muitas bactérias pertencentes a esse gênero crescem em leite a temperaturas de 4 ºC, sob condições aeróbias, e produzem proteases suficientes para hidrolisar toda a caseína em peptídeos solúveis (Champagne et al., 1993; citados por Sørhaug e Stepaniak, 1997). Algumas espécies também são reconhecidas por produzirem quantidades consideráveis de enzimas lipolíticas (Cousin, 1982; Sørhaug e Stepaniak, 1991).

A contaminação de leite e derivados por *Pseudomonas* spp é relacionada a fatores como suprimento de água de baixa qualidade, deficiências nos procedimentos de higienização na fonte de produção e também na indústria processadora (Enetoth, Ahrné e Molin, 2000). A contaminação pós-pasteurização é apontada como a principal causa de deterioração de leite pasteurizado durante a estocagem refrigerada (Wiedmann et al., 2000).

A atividade enzimática de proteases produzidas por bactérias psicrotróficas afeta as propriedades do leite cru e a qualidade de produtos lácteos tratados termicamente (Law, 1979; Gregory, Mitchell e Ewings, 1986). Estas enzimas,

juntamente com as lipases, incluindo as fosfolipases, têm grande importância econômica por serem produzidas e excretadas para o meio extracelular, onde podem agir diretamente sobre as micelas de caseína e sobre os glóbulos de gordura, degradando os componentes do leite e reduzindo a vida útil do produto (Cousin, 1982).

As proteases produzidas por psicrotróficos, especialmente *P. fluorescens*, têm sido bem caracterizadas (Gregory, Mitchell e Ewings, 1986; Sørhaug e Stepaniak, 1991; Margesin e Schinner, 1992; Kumura, Mikawa e Saito 1993; Villafafila et al., 1993; Liao e McCallus, 1998; Recio et al., 2000; Rajmohan, Dood e Waites, 2002; McCarthy, 2003). As proteases de *Pseudomonas* são, na sua maioria, metaloenzimas contendo um átomo de zinco e mais de oito átomos de cálcio por molécula. Apresentam atividade sobre o leite, sendo capazes de degradar porções da molécula de caseína, porém apresentam atividade baixa sobre as proteínas do soro (Sørhaug e Stepaniak, 1997). Estas enzimas são estáveis a temperaturas altas (Liao e McCallus, 1998) e resistem aos tratamentos de pasteurização e esterilização comercial (Gregory, Mitchell e Ewings, 1986; Rajmohan, Dood e Waites, 2002). Entretanto, são sensíveis a temperaturas na faixa de 50 ºC a 60 ºC devido a autodegradação, apresentam atividade ótima em torno de 30 ºC a 45 ºC e a baixa energia de ativação que elas apresentam, as tornam mais ativas do que as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos nas temperaturas de refrigeração (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

Diversos fatores nutricionais e ambientais podem afetar a produção de proteases. Segundo Malik, Prasad e Mathur (1985), a suplementação de meio a base de 1 % de triptona com 0,25 % de extrato de levedura e a adição de 0,2 % de sais de fosfato de potássio resultaram em aumento significativo na produção de proteases. Porém, açúcares fermentescíveis, como glicose, inibiram a produção destas. A atividade enzimática foi maximizada em pH 7,0 e quando o microrganismo foi cultivado sob agitação na temperatura de 22 ºC. A adição de glicose ao leite reduziu a atividade proteolítica de *P. fluorescens*, indicando que a produção de proteases pode ser regulada por repressão catabólica (Jaspe et al., 1994). A produção da protease AprX por *P. fluorescens* CY091 foi dependente da presença de $CaCl_2$ (Liao e McCallus, 1998). Rajmohan, Dood e Waites (2002) verificaram que a produção de proteases por *P. fluorescens* foi máxima em meio mínimo contendo 1 mmol L^{-1} de $CaCl_2$.

As enzimas extracelulares de microrganismos, denominadas hidrolases, são secretadas principalmente no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento (Griffths, 1989; Sørhaug e Stepaniak, 1991; Matselis e Roussis, 1998). Em

estudo realizado por Malik (1985), foi verificada que a produção de proteases iniciou-se quando a cultura de *Pseudomonas* sp. B-25 havia atingido concentração populacional de 10^9 UFC mL^{-1}. Griffths (1989) verificou que a produção de proteases e lipases não ocorreu enquanto as células não alcançaram o final da fase logarítmica ou o início da fase estacionária de crescimento. Em queijo, segundo Sørhaug e Stepaniak (1991), o desenvolvimento de *off-flavor* e problemas de textura, em razão da presença de enzimas hidrolíticas, ocorreu somente quando a contagem de psicrotróficos na matéria-prima alcançou 2 x 10^6 UFC mL^{-1} a 5 x 10^8 UFC mL^{-1}. Matselis e Roussis (1998) constataram que uma estirpe de *P. fluorescens* produziu quantidades significativas de lipases e proteases durante a idiofase, quando a cultura atingiu contagens de 10^7 a 10^8 UFC mL^{-1} e 10^8 a 10^9 UFC mL^{-1}, respectivamente. Dogan e Boor (2003) concluíram que defeitos de *flavor* em leite processado estavam associados a altas contagens bacterianas e a atividade enzimática degradativa de estirpes de *Pseudomonas* contaminantes.

Porém, existem trabalhos que relatam atividade proteolítica na presença de baixas densidades populacionais de bactérias proteolíticas. Wiking et al. (2002) detectaram aumento na proteólise a 4 ºC e 8 ºC, após 72 h de estocagem, mesmo na presença de pequeno número de células, sugerindo que, possivelmente, a proteólise ocorreu pela atividade do sistema plasmina/plasminogênio, naturalmente presente no leite. Haryani et al. (2003) também constataram pouca correlação entre a contagem de psicrotróficos e atividade proteolítica em leite estocado a temperaturas baixas. Existem também relatos de que o aumento da atividade proteolítica durante a fase estacionária ou de morte celular pode ser resultado da liberação de enzimas pré-formadas das células (Griffiths, 1989; Rajmohan, Dood e Waites, 2002).

2.2. *Quorum sensing*

Os microrganismos possuem diversos sistemas de regulação gênica que permitem resposta aos estímulos ambientais e adaptação às flutuações ocorridas no meio (Withers, Simon e Williams, 2001; Whitehead et al., 2001). Diversos fatores ambientais podem levar a ativação ou repressão de determinados genes. A expressão gênica diferenciada pode ser mediada por mecanismos de transdução de sinais como por exemplo, os sistemas de dois componentes (Stock, Robinson e Goudreau, 2000), por

fatores sigma (Wõsten, 1998) e por mudanças topológicas no DNA mediadas ou não por proteínas (Whitehead et al., 2001).

Na natureza, as bactérias apresentam-se como grupos coerentes capazes de habitar nichos ecológicos diversos (Shapiro, 1998; Lasdunski, Ventre e Sturgis, 2004). Muitas bactérias apresentam um sistema elaborado de comunicação entre células, permitindo que uma dada espécie possa sentir, integrar e processar informações do seu ambiente, comunicar-se umas com as outras e monitorar a sua própria densidade populacional, ativando ou reprimindo a expressão gênica. Este sistema de comunicação dependente de densidade populacional em bactérias foi primeiramente chamado de *quorum sensing* (Fuqua, Winans e Greenberg, 1994). O *quorum sensing* é um mecanismo de transdução de sinal pelo qual bactérias podem modular diversas funções celulares, dentre elas esporulação, formação de biofilme, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de antibióticos, pigmentação e bioluminescência de acordo com a densidade populacional (Smith, Fratamico e Novak, 2004).

Apesar da diversidade de sistemas de sinalização existentes em bactérias, um comportamento comum é observado quando a sinalização depende de densidade populacional (Gray, 1997). Nestes sistemas, tal regulação é mediada pelo acúmulo de uma ou mais moléculas sinalizadoras produzidas pela célula e excretadas para o meio externo. Estes compostos, denominados autoindutores ou feromônios bacterianos, não são detectados pelos indivíduos de uma população se a densidade celular for baixa (Fuqua, Winans e Greenberg, 1996; Gray, 1997). Porém, quando uma concentração crítica destas moléculas é alcançada no meio externo, o que corresponde a uma densidade celular alta ou quorum, toda a população pode então iniciar uma ação conjunta com a expressão coordenada de determinados genes (Fuqua, Winans e Greenberg, 1996; Whitehead et al., 2001; Smith, Fratamico e Novak, 2004; Tjalsma et al., 2004).

Em bactérias Gram-negativas, o sistema *quorum sensing* possui, basicamente, quatro características principais: síntese e acúmulo da molécula indutora por uma proteína sintase; ligação do indutor à proteína receptora; ligação da proteína receptora ativada à região promotora do gene alvo, atuando como regulador transcricional e; ativação ou repressão de características fenotípicas específicas (Gram et al., 2002).

O fenômeno é comum entre bactérias permitindo que estes microrganismos acessem nutrientes ou determinados nichos, monitorem respostas contra hospedeiros

eucarióticos ou organismos competidores e otimizem a capacidade de se adaptarem a ambientes hostis (Swift et al., 2001).

Segundo Schauder e Bassler (2001), este mecanismo permite que procariotos tenham comportamento similar a organismos multicelulares e traz benefícios que não seriam alcançados por esses organismos como indivíduos. Donabedian (2003) sugeriu que deve haver alguma vantagem para as bactérias ao expressarem determinados genes somente quando a densidade populacional é suficientemente alta. O sistema pode conferir à célula economia de energia, pela não expressão de fenótipos requeridos somente em populações altas quando a densidade populacional é baixa (Gram et al., 2002). Uma massa de células é necessária para produção suficiente de fatores extracelulares capazes de influenciar o ambiente vizinho; um gasto desnecessário de energia seria realizado se as bactérias começassem a produzir estes fatores antes que uma população mínima fosse atingida (Greenberg, 2000). Em patógenos, por exemplo, uma expressão gênica de fatores de virulência reduzida é mantida quando a densidade populacional encontra-se baixa, evitando que o organismo hospedeiro inicie uma resposta imune. Quando um número suficiente de bactérias é alcançado, há a expressão dos genes de virulência e, assim, as bactérias são capazes de vencer as defesas do hospedeiro (Bauer e Robinson, 2002; Donabedian, 2003).

As moléculas sinalizadoras envolvidas no mecanismo *quorum sensing* em bactérias podem ser divididas em quatro categorias:

(i) Autoindutor-1 (AI-1): Moléculas derivadas de ácidos graxos, utilizadas por bactérias Gram-negativas para comunicação intraespecífica e que possuem estrutura de homoserina lactona acilada (AHL) (Eberl, 1999; Miller e Bassler, 2001; Whitehead et al., 2001);

(ii) Autoindutor-2 (AI-2): Furanosil borato diéster, utilizada por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas para comunicação intra e interespecífica (Bassler et al., 1993; Schauder e Bassler, 2001);

(iii) Autoindutor-3 (AI-3): Estrutura ainda desconhecida, presente em *Escherichia coli* O157:H7 (Sperandio et al., 2003); e

(iv) Aminoácidos e pequenos peptídeos utilizados por bactérias Gram-positivas para comunicação intraespecífica (Miller e Bassler, 2001; Schauder e Bassler, 2001; Whitehead et al., 2001).

É provável que existam outros sistemas de comunicação dependentes de densidade populacional. Em *Vibrio cholerae,* por exemplo, existem pelo menos três

sistemas que atuam em paralelo e regulam a expressão de genes de virulência (Miller et al., 2002).

O *quorum sensing* é um mecanismo que pode ser influenciado por outras condições, sugerindo que o acúmulo de autoindutores é somente um critério, entre muitos, que as bactérias utilizam antes de ativar certas funções no grupo (Gray, 1997; Withers, Simon e Williams, 2001). Desta forma, estes microrganismos podem iniciar atividades de grupo diferentes, dependendo das condições ambientais que a população está enfrentando. Várias funções na célula são controladas por sistemas múltiplos que muitas das vezes se sobrepõem. Assim, o devido cuidado deve ser observado antes de designar uma determinada função como verdadeiramente sendo resposta de uma molécula sinalizadora (Gray, 1997). Como as bactérias podem ser capazes de sentir diversos fatores ambientais, Withers, Simon e Williams (2001) questionaram como os sinais relacionados ao *quorum sensing* estão integrados com todos os outros sinais químicos e físicos. Winzer, Hardie e Williams (2002) afirmaram que uma experimentação cuidadosa é requerida para identificar sistemas microbianos de comunicação célula-célula.

Embora existam outros mecanismos de sinalização dependentes de quorum entre bactérias, os sistemas tipo LuxR-LuxI estão entre os mais bem compreendidos. Estes sistemas são responsáveis por regular funções requeridas para interações microrganismo-hospedeiro, o que os torna de grande importância para o combate de doenças infecciosas e para a obtenção de benefícios pelas atividades microbianas (Fuqua e Greenberg, 2002).

Nos sistemas tipo LuxI-LuxR, as moléculas sinalizadoras são as homoserinas lactonas aciladas (AHLs), que têm sido identificadas em um grande número de Proteobacterias. Estas moléculas possuem uma cadeia de ácido graxo ligada a uma homoserina lactonada via ligação amida (Fuqua e Greenberg, 2002). As moléculas de AHLs podem variar de espécie para espécie ou mesmo dentro da própria espécie. O comprimento da cadeia acila pode estar entre quatro e 16 carbonos, usualmente em número par. O carbono três da cadeia acila pode ser uma carbonila, carregar uma hidroxila ou estar totalmente reduzido (Figura 1, Tabela 1) (Fuqua, Parsek e Greenberg, 2001; Fuqua e Greenberg, 2002). São estas características da cadeia que conferem especificidade ao sistema *quorum sensing*.

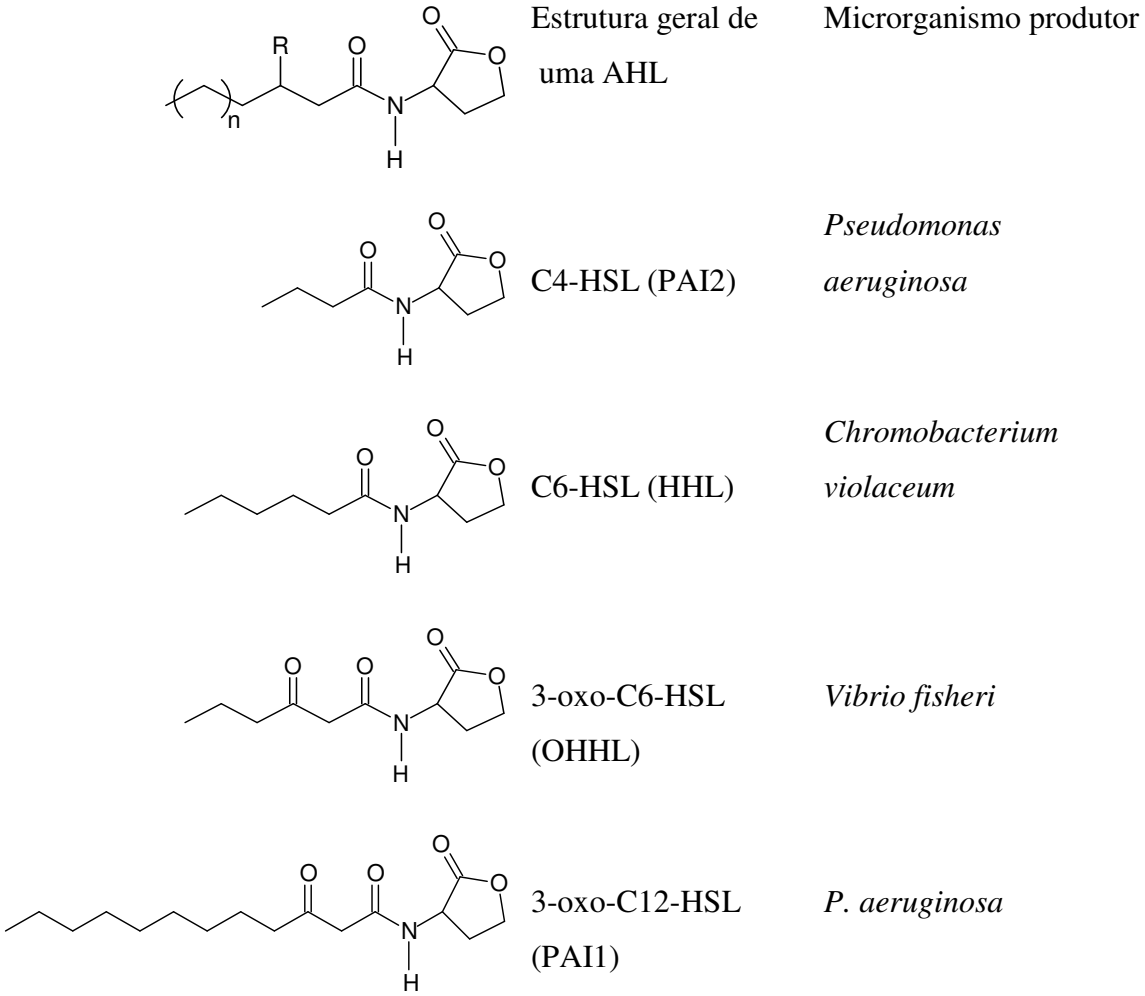


Figura 1 - Cadeias de homoserinas lactonas aciladas, onde R pode ser: =O, -OH ou –H; n= 0, 1, 2, 3, 4, 5. Adaptado de Fuqua, Winans e Greenberg (1996); Fuqua, Parsek e Greenberg (2001); Gram et al. (2002).

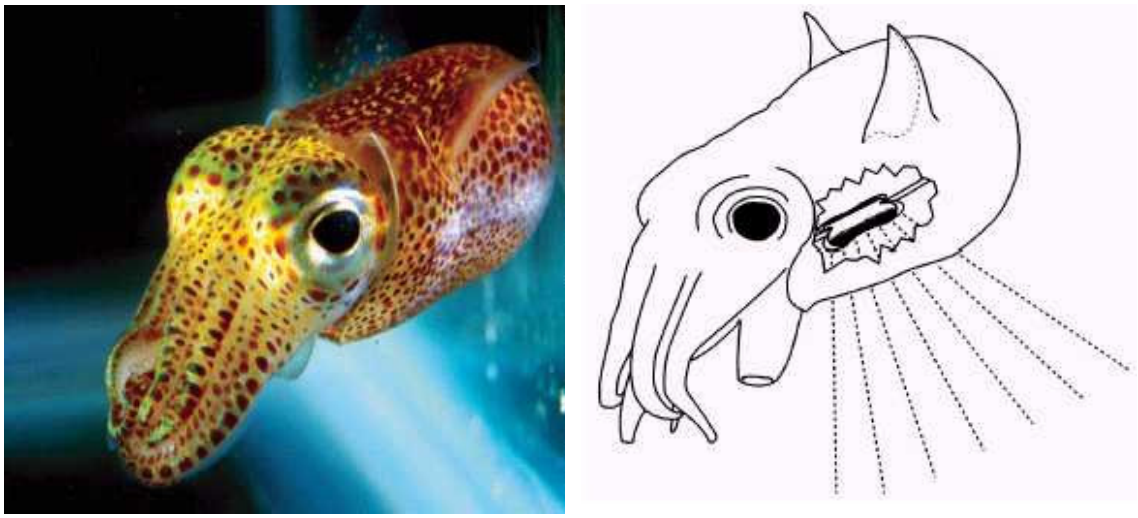
Tabela 1 - Regulação de fenótipos bacterianos por *quorum sensing* via sinalização por homoserina lactona acilada em algumas bactérias Gram-negativas.

Microrganismo	Proteínas regulatórias	Principal AHL	Fenótipo regulado
Aeromonas hydrophila	AhyI, AhyR	C4-AHL	Exoprotease
Agrobacterium tumefaciens	TraI, TraR	3-oxo-C8-AHL	Conjugação de plasmídeo de virulência
Burkholderia cepacia	CepI, CepR	C8-AHL	Proteases e sideróforos
Chromobacterium violaceum	CviI, CviR	C6-AHL	Exoenzimas, antibióticos, violaceína
Erwinia carotovora subsp. Carotovora	CarI, CarR ExpI, EspR	3-oxo-C6-AHL	Antibiótico Carbapenem e exoenzimas
Pantoea stewartii	EsaI, EsaR	3-oxo-C6-AHL	Exopolissacarídeo
Pseudomonas aeruginosa	LasI, lasR RhlI, RhlR	3-oxo-C12-AHL C4-AHL	Virulência, formação de biofilme e outras funções celulares
Pseudomonas fluorescens	MupI, MupR HdtS, ? PhzI, PhzR	C6,C10,C14:1-AHL	Antibiótico mupirocina Antibiótico fenazina
Pseudomonas putida	PpuI, PpuR	3-oxo-C6-AHL, 3-oxo-C8-AHL 3-oxo-C12-AHL	Influencia o desenvolvimento estrutural de biofilmes
Pseudomonas syringae	PsyI, PsyR	C6-AHL 3-oxo-C6-AHL	Desconhecido
Serratia liquefaciens	SwrI, SwrR	C4-AHL	Motilidade, Protease
Vibrio fischeri	LuxI, LuxR	3-oxo-C6-AHL	Bioluminescência
Yersinia enterocolitica	YenI, YenR	C6-AHL	Desconhecido

Fonte: O site do q*uorum sensing*: www.nothinghan.ac.uk/quorum/table.htm e Cui (2004).

O exemplo mais bem caracterizado de autoindução é a produção de bioluminescência pela bactéria marinha *Vibrio fischeri*. O mecanismo de autoindução deste microrganismo foi descrito pela primeira vez no início da década de 70

(Nealson, Platt e Hastings, 1970; Eberhard et al., 1972) e a estrutura da molécula sinalizadora foi determinada na década de 80 (Eberhard et al., 1981). Esta bactéria é um simbionte que habita os órgãos luminosos de certos peixes marinhos e lulas, ocorrendo também livremente na água do mar (Ruby, 1996). A simbiose entre *V. fischeri* e a lula *Eupryma scolopes* (Figura 2) é a associação mais bem estudada (Ruby, 1996; Whitehead et al., 2001). *E. scolopes* possui uma aparência bioluminescente em ambientes escuros devido à manutenção de um número elevado de bactérias em seu órgão luminoso. À noite, dentro do órgão, o microrganismo atinge população de 10^{10} a 10^{11} células por mL, apresentando luminescência. No entanto, na água do mar a espécie encontra-se em um número inferior a 10^{2} células por mL, não exibindo o fenômeno (Fuqua, Winans e Greenberg, 1996). A bioluminescência é explorada pela lula para realizar um comportamento chamado contra-iluminação, que a ajuda a se camuflar de predadores; em troca, ela fornece os nutrientes para o crescimento bacteriano (Graf e Ruby, 1998).



A **B**

Figura 2 - A lula *E. scolopes*, um dos hospedeiros da bactéria *V. fisheri*. A- Uma lula adulta da espécie *E. scolopes* que possui cerca de 2 cm de comprimento e abriga em seu órgão luminoso aproximadamente 10^{10} a 10^{11} células mL^{-1} da bactéria *Vibrio fischeri*. Esta bactéria é a única cultivada no órgão luminoso desta lula e produz luminescência durante a noite. Pela manhã, o hospedeiro expele, aproximadamente, 95% da cultura bacteriana para o meio, as células remanescentes continuam a crescer e são capazes de alcançar um número suficiente para produzir luminescência durante a noite, mantendo um ciclo diário. B– Esquema ilustrando o adulto e a emissão de luminescência a partir do órgão luminoso. Fonte: A- Ladzdunski et al. (2004), B– Ruby (1996).

O sistema de *quorum sensing* em *V. fischeri* constitui-se da proteína LuxI, responsável pela síntese de AHL, da proteína receptora denominada LuxR, uma seqüência no DNA denominada box *lux*, localizada na região promotora dos genes alvos e um grupo de genes de bioluminescência (Whitehead et al., 2001).

A base molecular dos estádios iniciais da indução de bioluminescência em *V. fisheri* envolve uma interação entre a molécula sinalizadora N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (OHHL) e a proteína reguladora de resposta LuxR (Engebrecht e Silverman, 1984). *V. fischeri* expressa *luxI* em um nível basal quando em densidades populacionais baixas, assim, a concentração de OHHL no meio permanece baixa. Entretanto, à medida que a densidade celular aumenta, a concentração de OHHL também aumenta. Uma vez atingida uma concentração crítica, correspondente a uma densidade celular particular ou quorum de bactérias, a molécula indutora OHHL se liga à proteína LuxR. A proteína ativada se liga a uma região do DNA, conhecida como box *lux* (Egland e Greenberg, 2001). Após ligar-se a este sítio, há a indução da transcrição de *lux*-ICDABEG e *lux*R (Figura 3), com um conseqüente aumento das concentrações celulares de mRNA de funções de bioluminescência e síntese de OHHL. As novas moléculas de OHHL podem então ativar mais proteínas LuxR, permitindo que a bioluminescência e a sua própria produção continuem, gerando um *feedback* positivo (Engebrecht e Silverman, 1984; Fuqua, Winans e Greenberg, 1996; Whithehead et al., 2001).

Em função do mecanismo de autoindução não iniciar até que seja atingida uma densidade celular particular, células individuais de *V. fischeri* evitam gastar uma quantidade considerável de energia requerida para a bioluminescência quando não associadas ao hospedeiro (Whithehead et al., 2001).

Algumas evidências sugerem que a proteína LuxR está associada à membrana plasmática pelo domínio N-terminal (Kolibachuk e Greenberg, 1993). Esta proteína é composta por dois domínios, um C-terminal de ligação ao DNA (Choi e Greenberg, 1991), e um N-terminal de ligação a AHL (Hanzelka e Greenberg, 1995). O domínio C-terminal de proteínas tipo LuxR possui um motivo hélice-volta-hélice, a exemplo de outras proteínas de ligação ao DNA (Choi e Greenberg, 1991; Zhang et al., 2002). O domínio C-terminal de LuxR, quando super expressado *in vivo*, foi capaz de induzir a transcrição de genes de bioluminescência (Choi e Greenberg, 1991) e tem sido constatado, *in vitro*, que este domínio facilita a ligação da RNA polimerase ao promotor

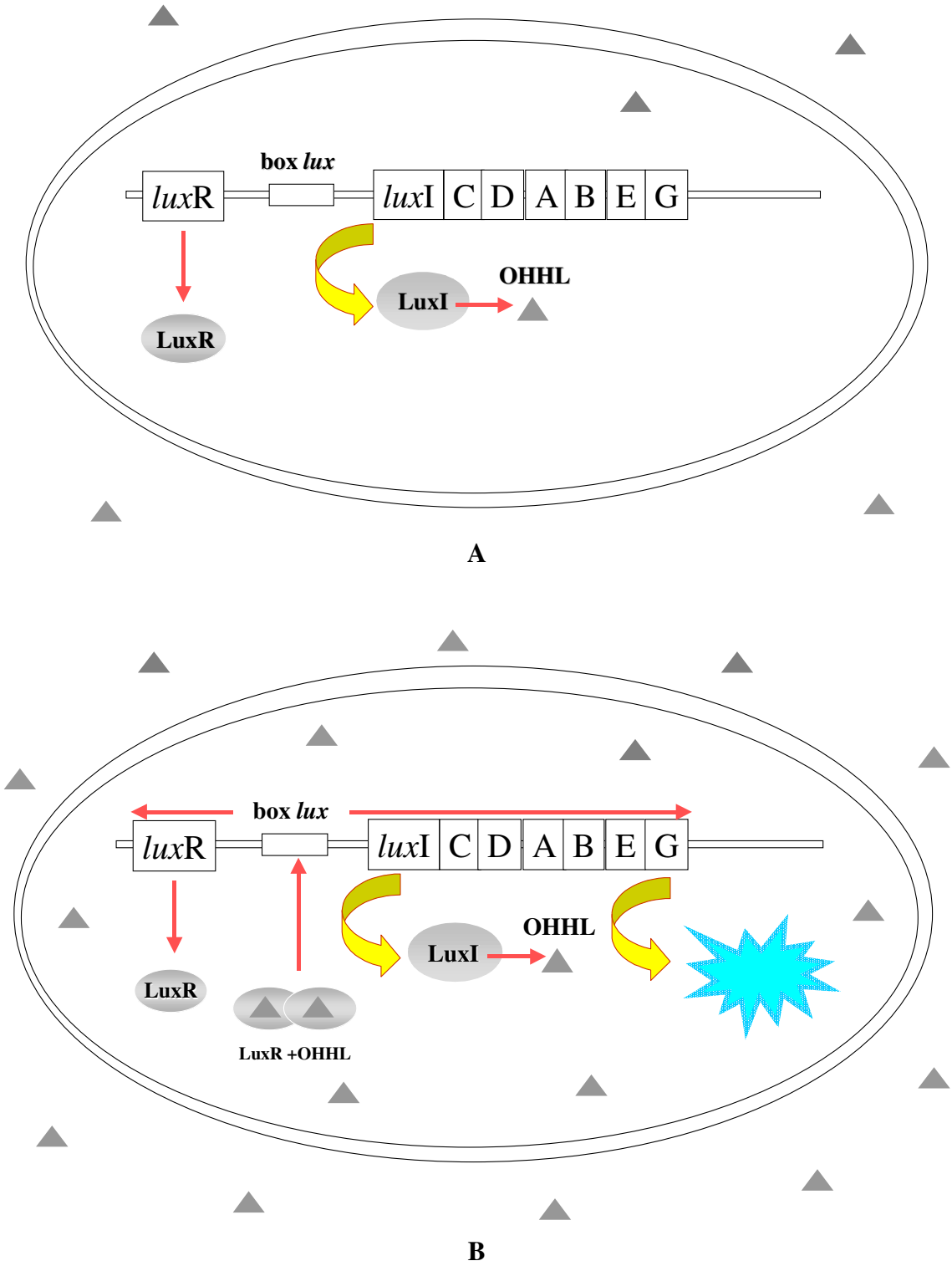


Figura 3 - O sistema LuxI/LuxR da bactéria Gram negativa *V. fisheri*. A- A proteína LuxI sintetiza o autoindutor denominado N-3-oxohexanoil homoserina lactona (OHHL) em quantidades basais e a transcrição dos genes de bioluminescência não ocorre. B- Quando uma determinada densidade populacional é atingida, há um aumento na concentração do autoindutor que se liga a proteína LuxR ativando a transcrição nos dois sentidos dos genes *lux*R e *lux*ICDABEG.

alvo (Stevens, Dolan e Greenberg, 1994). O domínio de ligação da proteína TraR, homóloga de luxR, à molécula sinalizadora parece prover uma interface de dimerização extensiva, enquanto o domínio de ligação ao DNA contribui para interações adicionais (Zhang et al., 2002). Quin et al. (2000) citados por Zhang et al. (2002) concluíram que a ligação de AHL leva a uma dimerização de TraR, sua liberação da membrana citoplasmática e aumento de sua estabilidade.

A região do DNA na qual a proteína LuxR se liga é conhecida como box *lux*. Em *V. fischeri*, o box *lux* é um elemento de 20 pb com simetria, localizado a 40 pb *upstream* dos genes regulados por LuxR. Seqüências tipo box *lux* já foram identificas em genes regulados por *quorum sensing* em outros microrganismos, embora nem todos os genes regulados por este mecanismo sejam precedidos por seqüências deste tipo (Cui, 2004). Enquanto um box *lux* mínimo ainda não foi definido, uma seqüência consenso tem sido determinada por alinhamento com outras seqüências *upstream* dos promotores regulados por homólogos de LuxR (Fuqua, Winans e Greenberg, 1994; Gray et al., 1994) (Figura 4).

Box lux de *V. fisheri* MJ1 A C C **T G** T **A** G **G A T** C G **T** A **C A** G G **T**

Consenso tipo box *lux* R N S **T G** Y **A** X **G A T** N X **T** R **C A** S R **T**

Figura 4 – A seqüência de nucleotídeos do box *lux* de *V. fisheri* MJ1 e uma seqüência consenso para elementos tipo box *lux* encontrados em regiões promotoras de genes regulados por homólogos de LuxR. Seqüência consenso, abreviações: N=A,T,C ou G; S=C ou G; Y=T ou A; X=N ou um *gap* na seqüência (adaptado de Cui, 2004).

Todas as proteínas tipo LuxI parecem ser ortólogos que catalisam a formação de AHLs. Estas enzimas dirigem a formação da ligação amida entre a cadeia acila e o grupo amino de S-adenosilmetionina (SAM) (Hanzelka et al., 1997; Whitehead et al., 2001). A síntese de AHLs requer SAM e precursores da via biossintética de ácidos graxos que são providos pelas proteínas carreadoras de grupos acilas denominadas de ACP (Moré et al., 1996).

2.3. *Quorum sensing* em outros microrganismos

Por muitos anos a pesquisa baseada na comunicação célula-célula via AHL ficou limitada a estudos com as bactérias marinhas *V. fischeri* e *V. haveyi*. Apenas no início dos anos 90 foi verificado que o sistema era comum em outras bactérias por meio de estudos realizados principalmente, com estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Erwinia carotovora*.

P. aeruginosa está freqüentemente associada à infecções em pessoas imunosuprimidas, especialmente aquelas com AIDS, fibrose cística ou ferimentos resultantes de queimaduras severas (Govan e Deretic, 1996). A patogenicidade de *P. aeruginosa* é dependente da sua capacidade de produzir e secretar diversos produtos extracelulares (Tabela 2) que estão sob o controle de dois sistemas de *quorum sensing*. Estes sistemas são do tipo LuxR-LuxI e funcionam de modo hierárquico (Parsek e Greenberg, 1999; de Kievit e Iglewski, 2000; Whitehead et al., 2001).

Tabela 2 - Fatores de virulência regulados por *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*.

Fatores de virulência	Referências
Elastase	Toder et al., 1994
Protease alcalina e exotoxina A	Gambelo et al., 1993
Proteínas de secreção	Chapon-Herve et al., 1997
Catalase e superóxido dismutase	Hassett et al., 1999
Raminolipídeo	Pearson, Pesci e Iglewski, 1997
Piocianina	Latifi et al., 1995; Brint e Ohman, 1995
Formação de biofilme	Donabedian, 2003
Homoserina lactona acilada	Latifi et al., 1995; Seed, Passador e Iglewski, 1995

Especificamente, o sistema LasI/LasR (homólogo a LuxI/LuxR) inicia uma cascata de sinalização por indução da transcrição de fatores de virulência em densidades celulares altas. A proteína LasI sintetiza uma molécula autoindutora identificada como 3-oxo-C12-AHL, usualmente referida como PAI-1 (Passador et al., 1993). Adicionalmente, LasI/LasR ativam a expressão de *rhlI* e *rhlR* que ativam genes que já

estão sob o controle de LasI/LasR, além de genes adicionais específicos. A proteína RhlI sintetiza uma segunda molécula sinalizadora, a C4-AHL, conhecida usualmente como PAI-2 (Latifi et al., 1996). A regulação RhlI/RhlR por LasI/LasR garante o estabelecimento de dois circuitos de *quorum sensing* que ocorrem de forma seqüencial. Além destes sinalizadores químicos, *P. aeruginosa* também produz outras duas moléculas uma, denominada sinal quinolona de *Pseudomonas* (SQP) e outra, denominada dicetopiperazina (DKP), que também estão envolvidas no sistema *quorum sensing* hierárquico desta bactéria (Pesci et al., 1999; Holden et al., 1999; Holden, Swift e Williams, 2000).

Segundo Donabedian (2003), a capacidade de *P. aeruginosa* em formar biofilme é reconhecida como um importante mecanismo de virulência. A formação de um biofilme de estrutura normal por *P. aeruginosa* estirpe PAO1 é dependente da síntese do autoindutor PAI1, como demonstrado por Davies, Parsek e Pearson (1998). Neste estudo foi observado que bactérias com o gene *las*I inativo produziram biofilmes que tinham apenas 20 % da espessura de um biofilme produzido pela estirpe selvagem. Ao adicionar a molécula sinal ao meio de cultivo, o mutante *las*I desenvolveu biofilmes iguais ao do organismo selvagem, indicando que a AHL era responsável pela arquitetura complexa observada em biofilmes maduros produzidos por esta bactéria. Em outro estudo realizado por Hassett et al. (1999), mutantes para o gene *las*I produziram biofilmes mais fracos e facilmente destrutíveis, apresentando maior susceptibilidade a agentes oxidantes, como peróxido de hidrogênio.

A formação de biofilme em *P. aeruginosa* envolve uma via programada. Segundo Parsek e Greenberg (2000), o *quorum sensing*, sob certas condições, desempenha alguma função na conversão de microcolônias sobre uma superfície em um biofilme maduro. Ainda não se sabe quais os genes estão sob o controle do *quorum sensing* no desenvolvimento do biofilme por *P. aeruginosa*, mas o requerimento da comunicação célula-célula durante a maturação do mesmo pode variar de acordo com as condições ambientais (Heydom et al., 2002). Segundo estudo realizado por Sauer et al. (2002), o *quorum sensing* seria responsável por apenas uma porção do número total de genes cuja regulação é alterada durante o estágio irreversível de desenvolvimento do biofilme. A implicação deste estudo é que o papel do *quorum sensing* e de outros mecanismos de sinalização não estão esclarecidos e que este complexo de sistemas estão sob controle intra e extracelular (Stoodley et al., 2002).

Em *Agrobacterium tumefaciens* o *quorum sensing* está envolvido na transferência de DNA oncogênico para o núcleo de células vegetais, induzindo a formação de tumor. O tumor secreta opinas que são usadas como nutrientes pelas bactérias e como sinal para transferência de plasmídeos Ti (indução do tumor) para células de *A. tumefaciens* contendo plasmídeos não Ti (Whitehead et al., 2001). A regulação de plasmídeos de conjugação Ti em *A. tumefaciens* é complexa e envolve várias proteínas. O propósito deste tipo de regulação via indução por opinas pode ser para garantir que todas as células da população sejam capazes de catabolizar opinas produzidas pelo tumor (Whitehead et al., 2001).

Em *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria encontrada no solo e água, a produção de violaceína, um pigmento roxo com atividade antibacteriana, é dependente da densidade populacional. Throup et al. (1995) verificaram que o sobrenadante da cultura de *C. violaceum*, em fase estacionária, era capaz de induzir bioluminescência em uma estirpe monitora de *E. coli* recombinante, indicando que *C. violaceum* produzia AHL. Estudos posteriores confirmaram que a produção de violaceína por *C. violaceum* era regulada por *quorum sensing* via HHL (McClean et al., 1997) e foi desenvolvido um sistema monitor baseado nesta característica.

V. harveyi, semelhantemente a *V. fischeri*, utiliza o mecanismo *quorum sensing* para regular genes relacionados à bioluminescência. Esta bactéria não utiliza um mecanismo *quorum sensing* tipo LuxI/LuxR como *V. fischeri* e outras bactérias Gram-negativas. Segundo Bassler et al. (1993), ela possui um sistema *quorum sensing* único, típico de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Especificamente, *V. harveyi* utiliza um autoindutor, homoserina lactona acilada, similar aos autoindutores de Gram-negativas. Entretanto, a detecção do sinal depende de mecanismo de *quorum sensing* baseado no sistema de dois componentes de Gram-positivas.

Dois circuitos integrados de *quorum sensing* governam os genes *lux* de *V. harveyi* e cada um pode induzir a bioluminescência independentemente. O sinal para um dos sistemas é a 3-hidroxi-C4-AHL. O segundo sistema é baseado em um sinal descrito originalmente como AI-2 (Figura 5) (Bassler et al., 1993; Chen et al., 2002). É crescente o número de evidências de que outras bactérias também respondem a sinais tipo AI-2 e que, por analogia ao *V. harveyi*, estes microrganismos podem também monitorar a presença de outras bactérias produtoras de AI-2 no ambiente local (Cui, 2004).

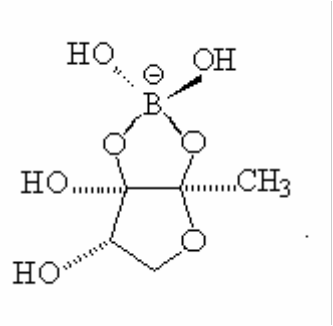


Figura 5 - Estrutura da molécula AI-2 (Chen et al., 2002).

2.4. Métodos de detecção de AHL

A verificação da produção de AHL tem tipicamente dependido de sistemas de monitoramento bacteriano (Swift et al., 1993; Cha et al., 1998; Gram et al., 1999). Esses sistemas monitores consistem de uma resposta fenotípica, como bioluminescência, produção do pigmento roxo violaceína ou atividade de β-galactosidase, ativada por uma proteína receptora de AHL (Ravn et al., 2001). Cada proteína receptora, denominada de proteína R, responde a diferentes AHLs (McClean et al., 1997; Cha et al., 1998; Winson et al., 1998).

As bactérias geralmente usadas como indicadoras da produção de AHL são *A. tumefaciens* A136 (Shaw et al., 1997), *C. violaceum* CV026 (McClean et al., 1997) e *E. coli* com plasmídeo pSB403 contendo a proteína LuxR de *V. fisheri* e genes de bioluminescência (Swift et al., 1993; Winson et al., 1998). Recentemente, Zhu et al. (2003) desenvolveram um bioensaio para detecção ultrasensível de AHLs com a estirpe *A. tumefaciens* KYC55. Esta estirpe foi capaz de detectar quantidades extremamente baixas de autoindutores, na ordem de pM, e foi usada para detectar AHL pela primeira vez na bactéria *Mesorhizobium huakuii*, um simbionte que fixa nitrogênio em associação com o legume *Astragalus sinicus*.

Um mesmo sistema monitor não é capaz de detectar todas as estirpes produtoras de AHL em uma população. Para Ravn et al. (2001), o ideal é usar mais de um sistema em uma análise. Segundo Gram et al. (1999), os sistemas monitores de AHL mais usados são *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403 pois detectam espectros de AHLs diferentes. Usando sistemas de monitoramento biológico é possível, de uma maneira rápida e menos onerosa, avaliar os tipos de AHLs produzidos (Shaw et al., 1997). A identificação de AHL pode ser baseada na separação das AHLs de extratos

bacterianos por cromatografia de camada fina (TLC), biorevelação com uma bactéria monitora e comparação com a corrida de padrões (Shaw et al., 1997; Ravn et al., 2001).

2.5. *Quorum sensing* – Como controlar a comunicação entre células?

O sistema de comunicação célula-célula está amplamente distribuído entre as bactérias e alguns mecanismos que inibem esta comunicação já estão sendo estudados. Dong et al. (2000) descobriram uma enzima de *Bacillus* sp. 240B1, denominada AiiA, que é capaz de degradar AHL. O gene *aiiA*, que codifica para a lactonase de *Bacillus,* foi clonado, seqüenciado e a introdução deste em *E. carotovora* reduziu significativamente a produção da molécula sinalizadora OHHL por esta bactéria e a concentração de enzimas pectinolíticas extracelulares em 10 vezes, atenuando a patogenicidade deste microrganismo contra diversas plantas (Dong et al., 2000). Plantas transgênicas construídas pela introdução do gene *aiiA* via transformação com *A. tumefaciens* demonstraram maior resistência à infecção por *E. carotovora* (Dong et al., 2001). A enzima lactonase atua hidrolisando o anel lactona e parece estar presente em diversas subespécies de *Bacillus* (Lee et al., 2002). Lin et al. (2003) clonaram um gene, denominado *aiiD*, que codifica para uma outra classe de enzimas capazes de degradar AHL, denominada de acilase. A enzima AiiD foi capaz de eliminar a comunicação célula-célula em *P. aeruginosa* e a virulência de *Caenorhabditis elegans*.

Furanonas halogenadas produzidas pela alga *Dalisea pulchra* inibem a expressão gênica mediada por AHL por interferir na ligação do indutor à proteína LuxR (Manefield et al., 2002). Vários trabalhos mostram a interferência de furanonas com o sistema *quorum sensing* em bactérias (Rice et al., 1999; Manefield et al., 2001; Ren, Sims e Wood, 2002).

Tateda et al. (2001) avaliaram o efeito do antibiótico azitromicina, usado para tratamento de várias infecções bacterianas, sobre o sistema *quorum sensing* em *P. aeruginosa*. Os autores verificaram que 2 $\mu g\ mL^{-1}$ de azitromicina inibiram o circuito *quorum sensing* em *P. aeruginosa* PAO1 e propuseram que o antibiótico interfere com a síntese das moléculas sinalizadoras, levando a uma redução da produção dos fatores de virulência.

Rasmussen et al. (2005) construíram um sistema para detecção de inibidores de *quorum sensing* e verificaram que vários compostos, tanto naturais quanto sintéticos,

apresentavam efeito sobre a comunicação célula-célula. Dentre estes compostos, o extrato de alho foi um dos mais ativos, apresentando especificidade contra genes de virulência em *P. aeruginosa* controlados por *quorum sensing* e reduzindo a tolerância de biofilmes desta bactéria ao antibiótico tobramicina.

2.6. *Quorum sensing* em bactérias deterioradoras de alimentos

Tem-se especulado que moléculas de AHL poderiam estar implicadas na regulação de fenótipos importantes na deterioração de alimentos (Gram et al., 1999; Christensen et al., 2003). Concentrações elevadas de AHLs têm sido detectadas em alimentos industrializados e muitas bactérias isoladas de alimentos associadas com a deterioração, como membros da família Enterobacteriaceae e espécies de *Pseudomonas*, produziram esse tipo de molécula (Laue et al., 2000; El-Sayed, Hothersall e Thomas, 2001; Ravn et al., 2001; Gram et al., 2002; Flodgaard et al., 2003).

A mera detecção de autoindutores em bactérias não fornece informação suficiente para determinar qual fenótipo está sendo regulado. Para elucidação deste evento, diversos experimentos podem ser realizados. Em *P. aeruginosa*, Whiteley et al. (1999) construíram uma biblioteca de genes regulados por AHL por meio de mutagênese insercional com o transposon Tn5, por meio de fusões randômicas do gene *lacZ* no cromossomo de mutantes duplos *las*I/*rhl*I, incapazes de sintetizar AHL. A inserção em genes controlados pelo *quorum sensing* podia ser monitorada pela expressão de β-galactosidase na presença e ausência das moléculas autoindutoras 3-oxo-C12-AHL e C4-AHL. Utilizando esta técnica, os autores verificaram que 39 genes estavam sob o controle do *quorum sensing*.

Utilizando uma técnica semelhante, Christensen et al. (2003) demonstraram que diversas enzimas hidrolíticas sintetizadas por *Serratia proteamaculans* B5a, uma bactéria deterioradora de alimentos, são reguladas por *quorum sensing*. Estes autores demonstraram ainda que o *quorum sensing* está envolvido na deterioração *in situ* em leite. Whan, Dunstall e Rowe (2000) sugeriram que o *quorum sensing* participa da regulação da atividade hidrolítica em *Pseudomonas* deterioradoras de leite. Porém, até o momento, apenas um resumo foi publicado no Annual Meeting Book of Abstracts do Istitute of Food Technologists (IFT) com estudo relacionado ao fato (Liu e Griffiths, 2003). Com base nos dados da literatura, Gram et al. (2002) sugeriram que, em virtude

do envolvimento freqüente de AHLs, tanto direta como indiretamente, na regulação de enzimas hidrolíticas extracelulares, a hipótese merece investigação.

Um sistema *quorum sensing* foi recentemente encontrado na estirpe NCIMB 10586 de *P. fluorescens* (El-Sayed, Hothersall e Thomas, 2001). Os produtos dos genes *mup*R e *mup*I apresentaram homologia às proteínas LaR/LuxR e LasI/LuxI, respectivamente. O gene *mup*R codifica uma proteína de 234 aminoácidos e tem uma massa molecular de 26 kDa; *mup*I codifica uma proteína de 191 aminoácidos com massa molecular de 21 kDa. Esses autores demonstraram ainda que o sistema *quorum sensing mup*R/*mup*I regula um grupo de genes responsáveis pela síntese do antibiótico mupirocina. Embora a molécula autoindutora da estirpe NCIMB 10586 não tenha sido identificada, várias outras já foram encontradas em diferentes estirpes de *P. fluorescens*.

Em um estudo realizado por Shaw et al. (1997), a estirpe 2-79 produziu até cinco moléculas diferentes de AHL conforme verificado por cromatografia de camada fina (TLC) e espectrometria de massa (MS). Três das AHLS foram identificadas como N-3-hidroxi-C6-HSL, N-3-hidroxi-C8-HSL, N-3-hidroxi-C10-HSL, uma sendo possivelmente N-C8-HSL e outra identificada por Cha et al. (1998) como sendo HHL. A estirpe F113 produz, pelo menos, três diferentes AHLs (Laue et al., 2000). Dentre as moléculas identificadas estavam: N-3-hidroxi-7-cis-tetradecenoil-HSL (3OH,C14:1-HSL); N-decanoil-HSL (C10-HSL) e HHL. Além disto, os autores identificaram um gene nesta estirpe, denominado *htd*S, que codifica a proteína HtdS capaz de sintetizar as três AHLs. A proteína HdtS possui massa molecular de 33 kDa e não pertence à família LuxI. Assim, HtdS pertence a uma terceira família de proteínas relacionadas a síntese de AHLs. Porém, outros estudos demonstraram que nenhuma AHL foi detectada nas estirpes 1855.344 (Cha et al., 1998), B52 (Allison et al., 1998) e pf 7-14 (Dumenyo et al., 1998). Holden et al. (1999) identificaram um composto que podia ativar a luminescência em uma estirpe monitora porém, este composto não era uma AHL, mas sim, uma dicetopiperazina (DKP). De acordo com Cui (2004), estes trabalhos demonstram a complexidade do *quorum sensing* e a existência de comunicação cruzada em sistemas de sinalização de *P. fluorescens*.

Elasri et al. (2001) verificaram que a produção de AHL parece ser mais comum entre *Pseudomonas* isoladas de plantas do que de solo. Em razão da existência de diferenças no perfil de AHL de *P. fluorescens* examinadas até a data, Cui (2004) sugeriu que pode haver correlação entre o hábitat e o perfil de produção de AHL nesta espécie.

O estudo do *quorum sensing* e sua relação com bactérias deterioradoras ou patogênicas isoladas de alimentos faz-se necessário para que haja uma melhor compreensão do papel deste sistema na ecologia de alimentos. Este conhecimento poderá contribuir para a geração de novas estratégias para o controle do crescimento de bactérias indesejáveis e da produção de metabólitos prejudiciais aos alimentos, apresentando um grande potencial para a preservação e segurança destes produtos.

Moléculas sinalizadoras de quorum já foram identificadas em muitas bactérias isoladas de diversas fontes. É possível que a produção de AHL seja freqüente entre isolados psicrotróficos proteolíticos de leite. Considerando que a expressão de genes relacionados ao *quorum sensing* está associada a altas densidades populacionais e, a produção de enzimas proteolíticas por estirpes de *P. fluorescens*, conforme verificado por diversos autores, inicia-se ao final da fase logarítmica e início da fase estacionária de crescimento, existe a possibilidade de que a produção de proteases, em *P. fluorescens*, esteja sob o controle do *quorum sensing*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1. Condições de Cultivo dos Microrganismos e Estocagem de Culturas

Cinqüenta e três isolados bacterianos psicrotróficos proteolíticos provenientes de amostras de leite cru refrigerado identificados por Pinto (2004) foram investigados quanto a produção de AHL. Os isolados foram cultivados em caldo Luria-Bertani (LB) contendo peptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,5 %, ao invés de 1 %, como descrito por Ravn et al. (2001). A incubação foi feita a 25 ºC por 24 h.

As estirpes monitoras foram também cultivadas em LB acrescido dos antibióticos apropriados: tetraciclina, a 4,5 μg mL^{-1} e espectinomicina, a 50 μg mL^{-1} para o cultivo de *A. tumefaciens* A136, canamicina, a 20 μg mL^{-1} para o cultivo de *C. violaceum* e tetraciclina, a 20 μg mL^{-1} para o cultivo de *E. coli* pSB403. As estirpes monitoras *A. tumefaciens* KYC55(pJZ410)(pJZ372)(pJZ384) e WCF47(pCF218)(pCF372) foram cultivadas em meio mínimo AT (Tempé et al., 1977). O meio AT foi adicionado dos antibióticos tetraciclina, na concentração de 2 μg mL^{-1}, espectinomicina, a 100 μg mL^{-1}, gentamicina, a 100 μg mL^{-1} para o cultivo da estirpe

KYC55 e dos antibióticos tetraciclina, a 2 μg mL^{-1} e canamicina, a 100 μg mL^{-1} para o cultivo da estirpe WCF47 (Zhu et al., 2003).

O isolado de *P. fluorescens* 07A foi cultivado sob diferentes condições conforme descrito no item 3.3. Todas as culturas usadas neste estudo foram mantidas congeladas em ultrafreezer, a –80 °C, em tubos de microcentrífuga contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) adicionado de 40 % de glicerol.

3.2. Transformação de *E. coli* DH5α com o plasmídeo pSB403

Células ultracompetentes de *E. coli* DH5α foram obtidas conforme Inoue (1990). A transformação foi realizada conforme Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Um μL do plasmídeo pSB403 (Figura 6) foi adicionado a 200 μL de uma suspensão de células ultracompetentes, contidas em um tubo de microcentrífuga. As células foram deixadas em repouso, por 30 min, em banho de gelo e então, submetidas a um choque térmico a 42 ºC, durante 1 min. Posteriormente, as células foram deixadas em banho de gelo. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de meio SOC (triptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM e glicose 20 mM) e a mistura foi colocada a 37 ºC por, 1 h, sob agitação de 200 RPM. Em seguida, alíquotas de 10, 50 e 100 μL foram plaqueadas por espalhamento, em superfície de ágar LB , acrescentado de 20 μg mL^{-1} de tetraciclina. Foi selecionada uma colônia dos transformantes, que foi utilizada como estirpe monitora de AHL. A estirpe transformante de *E. coli* DH5α foi estocada em tubos de microcentrífuga contendo caldo BHI acrescido de 40 % de glicerol e mantida sob congelamento a –80 ºC.

O plasmídeo pSB403 apresenta o gene que codifica a proteína que confere resistência ao antibiótico tetraciclina e os genes responsáveis pela bioluminescência, com exceção do gene *lux*I que codifica a sintase de AHL (Figura 6) (Winson et al., 1998).

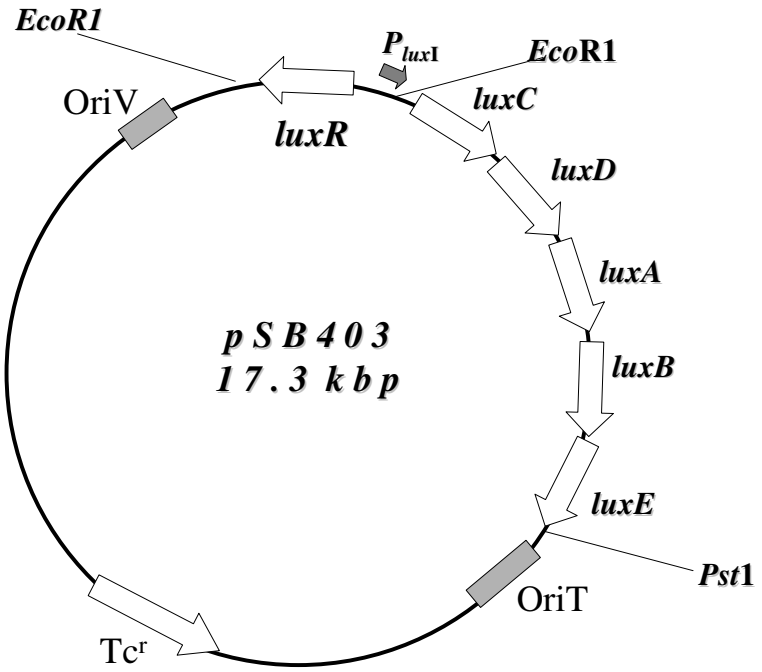


Figura 6 - Plasmídeo pSB403. O plasmídeo apresenta o gene que confere resistência ao antibiótico tetraciclina e os genes responsáveis pela síntese de LuxR e bioluminescência. Adaptado de Winson et al. (1998).

3.3. Detecção de microrganismos produtores de AHL em meio sólido e líquido

As bactérias monitoras foram cultivadas em meio LB solidificado com 1,2 % de ágar, quando necessário e suplementado com os antibióticos apropriados.

A produção de AHL por bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado foi avaliada em bioensaio realizado em meio sólido descrito por Ravn et al. (2001), utilizando as estirpes monitoras *C. violaceum* CV026, *E. coli* pSB403 e *A. tumefaciens* A136. Um resultado positivo para a estirpe CV026 foi a produção de violaceína, evidenciada pelo desenvolvimento de coloração roxa da cultura ou a inibição da produção desta coloração em meio suplementado com N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL). Para *E. coli* pSB403 foi a produção de bioluminescência, observada em sala escura e para a *A. tumefaciens* A136 a produção de β-galactosidase (β-Gal), evidenciada pela coloração azul da colônia.

As estirpes avaliadas foram ativadas em caldo LB a 25 ºC por, aproximadamente, 18 h e então, foram estriadas em ágar LB em paralelo à estirpe monitora. O teste com *A. tumefaciens* A136 foi conduzido de forma semelhante, porém o ágar foi suplementado com 50 μg mL^{-1} de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-

galactopiranosídeo (X-Gal). A estirpe *C. violaceum* CV026 é um mutante deficiente na produção de AHL e, conseqüentemente, violaceína. Porém, na presença de AHL exógena de cadeias laterais de quatro a seis carbonos, a cultura torna-se roxa. *E. coli* pSB 403 é uma estirpe transformante que produz luminescência na presença de AHLs de cadeias laterais de seis a oito carbonos com ou sem substituintes oxo. A estirpe *A. tumefaciens* A136 contém uma fusão do gene *lacZ* ao gene *traI* e produz uma coloração azul na presença de X-Gal em resposta a AHL, principalmente aquelas com substituições oxo.

O controle negativo deste experimento foi realizado estriando as estirpes monitoras paralelas a elas mesmas. Como controle positivo para a produção de AHL nos bioensaios com as estirpes *C. violaceum* CV02 e *E. coli* pSB403, foi utilizada a estirpe *C. violaceum* ATCC 6357, produtora de AHL de seis carbonos. Nos testes com a estirpe *A. tumefaciens* A136 como monitora, o controle positivo consistiu-se da estirpe de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, produtora de AHL de quatro e 12 carbonos.

A presença de cadeias longas de AHLs foi detectada em um bioensaio de inibição de *C. violaceum* CV026, estriando-se a estirpe a ser testada em LB suplementado com 75 nM de HHL. As placas foram incubadas por 24 h a 25 ºC e, logo após este período de incubação, a estirpe monitora *C. violaceum* CV026 foi estriada em paralelo à estirpe teste. Após reincubação a 25 ºC por mais 24 h, a ausência de coloração, devido à inibição da produção de violaceína, foi considerada um indicativo da presença de AHL de cadeia longa. Como controle negativo, foi utilizado a própria estirpe monitora e, como controle positivo, a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 15442.

O isolado de *P. fluorescens* 07A foi também avaliado quanto à produção de AHL em meio líquido AT em um bioensaio, desenvolvido neste trabalho, com as estirpes monitoras *A. tumefaciens* A136, *A. tumefaciens* WCF47 e *A. tumefaciens* KYC55. *P. fluorescens* 07A foi pré-ativada em meio AT por 24 h, a 25 ºC, sob agitação de 150 RPM. Em seguida, foi inoculada em 50 mL de meio AT e incubada sob as mesmas condições. Foi obtido o sobrenadante livre de células por centrifugação a 6 000 *g*, por 10 min, a 4 ºC, em centrífuga Sorvall RC5C (Dupont, EUA), seguido da esterilização por filtração em membranas Schleicher & Schuell (0,2 μm de poro e 25 mm de diâmetro) e estocagem a –20 ºC até o momento do ensaio. Aproximadamente 12 mL do sobrenadante, pré-aquecido a 40 ºC, foram adicionados à placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 40 μg mL^{-1} de X-Gal, os antibióticos apropriados para as

culturas *A. tumefaciens* A136, KYC55 e WCF47 e 5 mL do ágar AT, na temperatura de 50 ºC. Após a solidificação do meio, as estirpes monitoras foram estriadas e o surgimento da coloração azul foi monitorado periodicamente, por até 60 h de incubação, a 25 ºC. Foi também preparado ágar AT suplementado com 75 nM de HHL como controle positivo e ágar AT sem suplementos foi utilizado como controle negativo. A presença de AHL no sobrenadante esterilizado da cultura foi indicada pela produção de coloração azul, resultante da hidrólise de X-Gal pela estirpe monitora. Cada bioensaio foi realizado em duplicata e em duas repetições independentes.

3.4. Extração de AHL

A extração de AHL das estirpes *Serratia liquefaciens* 016 e *P. fluorescens* 07A foi realizada conforme descrito por Ravn et al. (2001), com modificações ou como Shaw et al. (1997). Após crescimento das culturas em 15 mL de caldo LB, as células foram removidas por centrifugação a 5 000 *g*, por 10 min, a 10 ºC e o sobrenadante foi esterilizado por filtração.

Aproximadamente 10 mL do filtrado obtido foram misturados com volume igual de acetato de etila acidificado com 0,5 % de ácido fórmico. A mistura foi agitada vigorosamente, por 30 s, em funil de separação por três vezes, permitindo-se a separação das fases entre os períodos de agitação. A fração orgânica foi retirada e outro igual volume de acetato de etila acidificado foi adicionado. O processo foi repetido por três vezes. As frações de acetato de etila foram combinadas e evaporadas em capela de exaustão, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 h. O resíduo foi ressuspendido em 3 mL de acetato de etila acidificado, filtrado em papel Whatman nº.1, e o solvente evaporado sob vácuo de 25 mm de Hg à temperatura de 25 ºC por, aproximadamente, 3 h. O conteúdo final foi ressuspendido em um volume de 0,5 a 1 mL de água destilada esterilizada. A presença de AHL no extrato foi verificada adicionando-se 30 µL do mesmo a pocinhos de 3 mm de diâmetro feitos em ágar LB 1,2 %, adicionado dos antibióticos apropriados e, X-Gal, na concentração de 50 µg mL^{-1} quando requerido. O meio foi inoculado previamente com, aproximadamente, 10^7 UFC mL^{-1} da estirpe monitora *C. violaceum* CV026 ou *A. tumefaciens* A136. A formação de halo roxo, resultante da produção de violaceína CV026 e o aparecimento da coloração

azul, resultante da hidrólise de X-Gal por *A. tumefaciens* A136 foram considerados resultados positivos para a presença de AHL.

Um volume de 100 mL de sobrenadante esterilizado, obtido da cultura de *P. fluorescens* 07A, cultivada em caldo LB por 14h e 18 h de incubação, a 25 ºC, sob agitação de 150 RPM, foi extraído com igual volume de acetato de etila, como descrito anteriormente. A presença de AHL neste extrato foi verificada pela adição de uma alíquota de 0,1 mL do mesmo a 15 mL de ágar AT suplementado com 40 μg mL^{-1} de X-Gal e os antibióticos apropriados para a estirpe *A. tumefaciens* KYC55. Foi também preparado ágar AT suplementado com 75 nM de HHL como controle positivo e ágar AT suplementado com 0,1 mL de água destilada esterilizada como controle negativo. A estirpe monitora foi estriada na placa e o surgimento da coloração azul foi monitorada periodicamente, por um período de até 60 h de incubação a 25 ºC. O experimento foi realizado em duplicata em duas repetições independentes. O extrato final obtido foi utilizado para o experimento de autoindução descrito no item 3.11.

3.5. Determinação da produção de AHL por *P. fluorescens* 07A em meio líquido

A estirpe *P. fluorescens* 07A foi cultiva sob agitação de 150 RPM, a 25 ºC, em agitador rotatório Psycrotherm (New Brunswick Scientific, EUA) em frascos de 500 mL contendo 200 mL dos meios TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % ou MMS (descritos no item 3.6). O inóculo inicial foi de, aproximadamente, 10^4 UFC mL^{-1}, e o crescimento celular foi monitorado por contagem de colônias em placas, pela técnica de microgotas (Morton, 2001). A partir de 13 h de incubação, volumes de 15 mL de sobrenadante da cultura, obtidos por centrifugação a 5 000 *g*, por 10 min, foram tratados com acetato de etila para extração de AHL. O resíduo final obtido foi ressuspendido em 500 μL de água destilada esterilizada. Uma alíquota de 100 μL do extrato final foi adicionada a 1 mL de meio AT contendo, aproximadamente, 10^7 UFC mL^{-1} da cultura de *A. tumefaciens* KYC55, pré-ativada no mesmo meio por 30 h, sob agitação de 150 RPM a 25 ºC, em um bioensaio ultrasensível para detecção de AHL, conforme descrito por Zhu et al. (2003). A cultura foi incubada sob agitação de 150 RPM por 12 h, a 25 ºC e a atividade específica de β-Gal determinada conforme Miller (1972), com modificações. Após o período de incubação, os tubos contendo as culturas foram colocados no gelo, por 20

min, para prevenir o crescimento celular. A absorvância a 600 nm foi lida para determinação do crescimento celular. Quinhentos µL da cultura foram adicionados a 500 µL de tampão Z ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 0,06 M; NaH_2PO_4 0,04 M; 0,01 M KCl; 0,001 M $MgSO_4.7H_2O$; 0,05 M β-mercaptoetanol por litro de água destilada, pH final 7,0) em um tubo de vidro. As células foram permeabilizadas por adição de 100 µL de clorofórmio, 50 µL de Sulfato Dodecil de Sódio (SDS) 0,1 % e agitação por 10 s, em agitador de tubos. Os tubos foram colocados em banho-maria a 28 ºC, por 5 min, a reação iniciada pela adição de 0,2 mL de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG - 4 mg mL^{-1}) seguindo-se de agitação em agitador de tubos por mais 10 s. O tempo de início da reação foi anotado e, após período suficiente para desenvolvimento de coloração amarela, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de uma solução de Na_2CO_3 1 mol L^{-1}. A densidade óptica a 420 nm e 550 nm foi lida em espectrofotômetro Beckman modelo DU640 (EUA) e a atividade enzimática, em Unidades Miller, foi avaliada conforme Equação 1. O experimento foi realizado em duplicata, com duas repetições independentes. Como controle positivo da reação, foram inoculados 750 nM de HHL dissolvidos em água e como controle negativo foi adicionada uma alíquota de 0,1 mL de água destilada esterilizada ao meio AT. O operon *lac* totalmente induzido apresenta cerca de 1 500 Unidades Miller, enquanto um não induzido apresenta de 1,5 a 3 unidades.

Equação 1:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times \frac{(DO_{420} - (1{,}75 \times DO_{550}))}{t \times v \times DO_{600}}$$

Sendo:

t = tempo de reação em minutos

v = volume da cultura usada no ensaio em mL

A estirpe *A. tumefaciens* KYC55 não produz moléculas autoindutoras, mas superexpressa a proteína TraR e possui uma fusão *traI-lacZ*, permitindo a detecção de AHL por indução da produção da enzima β-galactosidase, usualmente medida em Unidades Miller (UM) (Miller, 1972).

3.6. Crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo

O crescimento e a atividade proteolítica do isolado *P. fluorescens* 07A foram acompanhados em diferentes meios de cultura incluindo: caldo TYEP (triptona 1 %, extrato de levedura 0,25 %, KH_2PO_4 0,1 %, K_2HPO_4 0,1 %), caldo TYEP acrescentado de 0,5 % de lactose, caldo TYEP acrescentado de 0,5 % de glicose, Caldo TYEP + 0,25 % de $CaCl_2$, Meio Mínimo Sal (K_2HPO_4 0,7 %; KH_2PO_4 0,2 %; $MgSO_4.7H_2O$ 0,02 %; $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 %; glicerol 0,4 % e $CaCl_2$ 1 mmol L^{-1}), Leite Desnatado Reconstituído 12 % (LDR 12 %).

A incubação foi a 22 ºC, com agitação de 150 RPM em agitador rotatório. Periodicamente, durante o crescimento bacteriano, foram retiradas alíquotas para a determinação do número de células viáveis pela técnica de microgotas e determinação da atividade proteolítica. O experimento foi realizado em duplicata, com duas repetições independentes.

3.7. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica dos isolados psicrotróficos proteolíticos foi realizada no sobrenadante esterilizado da cultura, conforme técnica descrita por Rajmoham et al. (2002) com modificações. Alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante da cultura, obtido por centrifugação a 5 000 *g* por 10 min, foram adicionadas a 0,5 mL de solução de azocaseína (Sigma, Chemical Co-St, EUA) 0,5 % (p/v), dissolvida, por aquecimento, em tampão citrato 0,1 M, pH 6,0 e filtrada em papel de filtro Whatman nº.1; e a 0,5 mL de tampão citrato 0,1 M, pH 6,0. Após a incubação a 37 ºC por duas horas em banho-maria com circulação (Thermomix BM 18 BU de Braun Biotech International, Alemanha), adicionou-se à mistura de reação igual volume de ácido tricloacético, TCA a 10 % (p/v), seguindo-se de transferência dos tubos para banho de gelo, por 15 min. Para o controle de cada reação, o TCA foi adicionado antes da adição da amostra e após o período de incubação. As amostras foram clarificadas por centrifugação a 5 000 *g*, por 10 min, em microcentrífuga Sorvall modelo MC12V (Dupont, EUA) e a absorbância do sobrenadante foi medida a 366 nm, em espectrofotômetro Beckman DU640 (EUA).

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir um aumento de 0,01 unidades na absorvância a 366 nm por hora de incubação. A atividade proteolítica específica aparente foi definida como sendo atividade proteolítica por unidade de crescimento, determinada como proteína microbiana.

3.8. Determinação do pH e fluorescência dos meios após crescimento celular

O pH dos meios foi determinado antes e após o crescimento celular, por 80 h de incubação, a 22 ºC e agitação de 150 RPM. Uma alíquota de, aproximadamente, 20 mL de cada meio de cultivo foi centrifugada a 5 000 *g*, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi esterilizado por filtração e a medida de pH realizada em potenciômetro (Tradelab, Brasil).

A fluorescência de *P. fluorescens* 07A nos diferentes meios de cultivo foi determinada, após o crescimento nas condições especificadas anteriormente, em sala escura, expondo os frascos Erlenmeyer, contendo a cultura, à luz ultravioleta (UVGL – 58, Mineralight Lamp, EUA).

3.9. Determinação do consumo de glicose

O consumo de glicose durante o crescimento do isolado de *P. fluorescens* 07A foi acompanhado pela determinação do teor de glicose livre pelo método glicose oxidase-peroxidase (GOD-PAD, Biothecnica, Brasil), conforme instruções do fabricante.

3.10. Efeito da adição de ABL e HHL no crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A

Para avaliar o efeito da adição de α-amino-γ-butirolactona (ABL) e N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL) sobre o crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A, a cultura foi cultivada a 25 ºC, por 18 h, a 150 RPM em caldo Nutriente (peptona 0,5 %, extrato de carne 0,3 %, Na_2HPO_4 0,2 %, NaCl 0,3 %, pH

7,0). Após ativação, a cultura foi centrifugada por 20 min, a 4 000 *g*, a 6 ºC. O centrifugado foi ressuspendido em solução salina peptonada (peptona 0,1 %, NaCl 0,85 %), até a população de 10^8 UFC mL^{-1}. A suspensão de células foi submetida ao estresse frio, a –18 ºC, para induzir a fase lag (Whan, Dunstall e Rowe, 2000). O descongelamento foi em banho-maria a 20 ºC por 20 min. A cultura foi então inoculada em meio TYEP + 0,25 % de $CaCl_2$ com, aproximadamente 10^4 UFC mL^{-1}, suplementado com 7,5 µg mL^{-1} de HHL ou 5 µg mL^{-1} de ABL. O controle negativo foi realizado sem a adição de HHL ou ABL ao meio TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. O crescimento foi acompanhado por contagem de colônias pela técnica de microgotas e a atividade proteolítica do sobrenadante livre de células foi avaliada até a fase estacionária.

3.11. Efeito da adição de extrato de AHL, obtido de *P. fluorescens* 07A, sobre a atividade proteolítica da cultura em TYEP + $CaCl_2$.

P. fluorescens 07A foi ativada em 200 mL de TYEP, a 22 ºC sob agitação de 150 RPM, por 20 h de incubação. As células foram centrifugadas a 10 000 *g*, por 15 min, a 4 ºC. O centrifugado foi ressuspendido em 20 mL de meio TYEP e, novamente submetido à centrifugação, sob as mesmas condições descritas anteriormente. O centrifugado final foi ressuspendido em 10 mL de meio TYEP + $CaCl_2$, correspondendo a uma população final de, aproximadamente, 3,2 x 10^{10} UFC mL^{-1}. A cultura foi submetida a diluições seriadas e alíquotas da mesma foram adicionadas a tubos contendo 250 µL de extrato de AHL, obtido da cultura de *P. fluorescens* 07A cultivada por 20 h, a 22 ºC, em TYEP + $CaCl_2$ (item 3.4), correspondendo ao tratamento com AHL, ou 250 µL de extrato, obtido a partir de TYEP + $CaCl_2$ esterilizado, correspondendo ao controle. O volume final foi completado para 2,5 mL com meio TYEP + $CaCl_2$. A densidade populacional variou de 3,2 x 10^7 a 6,3 x 10^9 UFC mL^{-1} sendo: C1 e E1 correspondente ao tratamento controle e com extrato na população inicial de 3,2 x 10^7 UFC mL^{-1}; C2 e E2, a 3,2 x 10^8 UFC mL^{-1}; C3 e E3, a 3,2 x 10^9 UFC mL^{-1} e; C4 e E4, a 6,3 x 10^9 UFC mL^{-1}. A cultura foi avaliada após 1, 3, 6 e 10 h de incubação a 22 ºC, sob agitação de 150 RPM, quanto à atividade proteolítica e contagem de células viáveis pela técnica de microgotas. O experimento foi repetido por três vezes independentes. A atividade proteolítica específica foi definida como: (Unidades de enzimas proteolíticas x 10^{10}) / População (UFC mL^{-1}).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção de microrganismos produtores de AHL em meio sólido e líquido

Dos 53 isolados psicrotróficos proteolíticos avaliados, 10 apresentaram resultado positivo empregando-se os sistemas monitores constituídos por *C. violaceum* CV026 (bioensaio de indução) e *E. coli* pSB403 (Tabela 3), indicando ser o mesmo tipo de AHL produzida por estas estirpes, provavelmente contendo seis carbonos nas cadeias laterais. Outros cinco isolados apresentaram resultados positivos com o sistema monitor *E. coli* pSB403 e não apresentaram resposta com CV026 (bioensaio de indução) sendo, provavelmente, AHLs de cadeias laterais de oito ou mais carbonos.

As estirpes pertencentes ao gênero *Serratia* apresentaram alta diversidade de respostas aos diferentes sistemas monitores, indicando produção de diferentes moléculas de AHL. Resultado semelhante foi encontrado por Ravn et al. (2001).

Algumas estirpes apresentaram resultado positivo apenas no bioensaio de inibição com *C. violaceum* CV026, indicando serem produtoras de AHL de cadeia carbônica lateral longa. Dentre elas, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri*, *Rhanella aquatilis, Serratia odorífera* e todas as do gênero *Enterobacter* e *Klebsiella*. Ravn et al. (2001) também verificaram que algumas estirpes psicrotróficas isoladas de alimentos apresentavam resultado positivo para AHL apenas para este bioensaio e dentre as

Tabela 3 – Bactérias produtoras de AHL. Um resultado positivo foi observado tanto pela ativação da produção de pigmentação roxa (Bioensaio de indução) ou pela inibição da produção deste pigmento (Bioensaio de inibição) pela estirpe *C. violaceum* CV026, em meio contendo HHL; em *E. coli* pSB403 foi observada a indução de bioluminescência; e em *A. tumefaciens* A136, a formação da coloração azul pela hidrólise de X-Gal.

Isolados avaliados	Nº de isolados positivos em pelo menos um bioensaio	Nº de isolados negativos em todos os bioensaios	Nº de respostas em cada sistema monitor			
			CV 026		PSB403	A136
			Indução	Inibição		
Acinetobacter lwoffi 09	1		1	1	1	
Aeromonas hydrophila 099	1		1		1	
A. hydrophila 037 e 074	2			2		
A. hydrophila 079	1			1	1	
Burkholderia pseudomallei 026 e 056	2			2		
Cedecea lapagei 03		1				
Chryseobacterium miningosepticum 06	1				1	
Chryseomonas luteola 0145	1			1		
C. luteola 0107		1				
Enterobacter cloacae 01	1			1		
Enterobacter gergoviae 078	1			1		
Enterobacter sakasaki 030 e 080	2			2		
Hafnia alvei 059, 067 e 068	3		3		3	
Klebsiella oxytoca 088 e 093	2			2		
Klebsiella ozanae 060 e 086	2			2		
Moraxella catharralis 08	1			1		
M. catharralis 012	1		1		1	
M. catharralis 049	1		1	1	1	
Pantoea agllomerans 018 e 085	2			2	2	
Pantoea spp 025		1				
Providencia stuartii 051		1				
Pseudomonas fluorescens 07A, 033, 038, 041, 077, 0123 e 0136	7			7		7
P. fluorescens 057 e 0109	2					2
Pseudomonas putida 013 e 0134	2			2		
Pseudomonas stutzeri 0101	1			1		
Rhanella aquatilis 022	1			1		
R. aquatilis 017		1				
Serratia liquefaciens 020, 021, 091 e 0144	4			4		
S. liquefaciens 087	1			1	1	
S. liquefaciens 039	1		1		1	
S. liquefaciens 016	1		1	IC	1	
S. liquefaciens 053		1				
Serratia odorifera 071	1		1		1	
S. odorifera 0143	1			1		
Total: Isolados psicrotróficos (53)	**47**	**6**	**10**	**36**	**15**	**9**
Estirpes ATCC						
A. hydrophila ATCC 7966	1			1		
Citrobacter freundii ATCC 8090	1			1		1
C. violaceum ATCC 6357	1		1	IC	1	
E. aerogenes ATCC 13048	1			1		
P. fluorescens ATCC 13525	1			1		1
P. aeruginosa ATCC 15442	1			1	1	1
S. liquefaciens ATCC 27592	1			1		
Total: Estirpes ATCC (7)	**7**		**1**	**6**	**2**	**3**
Total avaliado (60)*	**54**	**6**	**11**	**42**	**17**	**12**

IC – Inibição do crescimento. * Foram avaliadas 60 estirpes no total, sendo que sete eram estirpes ATCC (Amercian Type Culture Colletion).

estirpes avaliadas estavam: *R. aquatilis*, *Serratia* spp., *Serratia proteamaculans* e *Enterobacter aglomerans*.

Observou-se que a maioria das espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae são produtoras de moléculas sinalizadoras incluindo bactérias do gênero *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rhanella* e *Serratia*. Swift et al. (1993), utilizando um sistema monitor sensível a OHHL, verificaram que várias Enterobacteriaceae produziam este autoindutor ou algum análogo semelhante. Os resultados obtidos são similares aos verificados por Gram et al. (1999) que, dentre 154 isolados psicrotróficos pertencentes à família Enterobacteriaceae, detectaram que pelo menos 75 % produziram moléculas de AHLs evidenciadas pelos sistemas monitores *C. violaceum* CV026 e *E. coli* pSB403. Com base nos resultados de análises de TLC e respostas dos sistemas monitores, os autores sugeriram que a principal AHL produzida poderia ser OHHL ou seus análogos. Entretanto, os fenótipos regulados por AHL não foram determinados. Ravn et al. (2001) verificaram que, dentre 148 isolados da família Enterobacteriaceae, 99 % eram produtores de moléculas sinalizadoras evidenciadas pelos mesmos sistemas monitores utilizados no presente trabalho.

A produção de AHL foi verificada em todas as 12 estirpes pertencentes ao gênero *Pseudomonas* avaliadas e nas duas estirpes de referência usadas (Tabela 3). Provavelmente, estas estirpes produzem AHLs de cadeias carbônicas longas, como verificado pela inibição da produção de violaceína pela estirpe CV026. Constatou-se que a estirpe monitora *A. tumefaciens* A136 foi a que apresentou maior capacidade de detectar AHL(s) produzidas por *P. fluorescens* (Tabela 3). Vários autores têm verificado a produção de AHL por diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* usando, principalmente, *A. tumefaciens* e *E. coli* transformada com plasmídeos biosensores de AHL como sistemas monitores (Gambello, Kaye e Iglewski, 1993; Shaw et al., 1997; Cha et al., 1998; Kojic, Degrassi e Venturi, 1999; Laue et al., 2000; Elasri et al., 2001; Cui, 2004). Entretanto, a produção destas moléculas por *Pseudomonas* isoladas de leite somente foi reportada por Liu e Griffths (2003) usando sistemas monitores baseados na emissão de luminescência.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a produção de moléculas sinalizadoras é comum entre os isolados psicrotróficos proteolíticos. É possível que estas moléculas sinalizadoras exerçam funções importantes na ecologia microbiana do leite, com possíveis implicações na deterioração deste produto e de derivados.

A combinação dos três sistemas monitores usados permitiu identificar 90 % das estirpes avaliadas como produtoras de AHL (Tabela 4). Porcentagens de altas de 75 % e 99 % de bactérias produtoras de AHL isoladas de alimentos também foram verificadas por outros autores (Gram et al., 1999; Ravn et al., 2001).

Tabela 4 – Porcentagem de isolados positivos em cada sistema monitor e porcentagem total (isolados psicrotróficos + estirpes ATCC) de estirpes produtoras de AHL.

	CV 026		PSB403	A136	Total geral
	Induzido	Inibido			
Isolados psicrotróficos proteolíticos	18,9	67,9	28,3	17,0	88,7
Estirpes ATCC	14,3	85,7	28,6	42,8	100
Total avaliado	18,3	70,0	28,3	20,0	90,0

O bioensaio de inibição com *C. violaceum* para detecção de AHL de cadeia longa (Figura 7) identificou a maior porcentagem de produtores de AHL. Este teste é indicativo da produção de AHL de cadeia acila lateral variando de 10 a 14 carbonos (McClean et al., 1997). Segundo estes autores, o ensaio de inibição deve ser interpretado com cuidado, em razão da presença de substâncias antibacterianas produzidas por muitas bactérias. Moléculas sinalizadoras de cadeia longa não inibem o crescimento da cultura monitora *C. violaceum* CV026 (Figura 7), enquanto agentes antibacterianos, se presentes em concentrações suficientes, podem inibir. No presente trabalho, o crescimento da cultura CV026 foi afetado pelo isolado de *S. liquefaciens* 016 e pela estirpe de referência *C. violaceum* ATCC 6357, não sendo possível avaliar se estas estirpes produzem AHL de cadeia acila lateral entre 10 a 14 carbonos.

4.2. Extração de AHL

Os isolados de *P. fluorescens* 07A e de *S. liquefaciens* 016 positivos para produção de AHL em ágar LB foram selecionados para avaliação da produção de AHL em meio líquido. Apenas o extrato obtido da cultura de *S. liquefaciens* 016 em caldo LB, após 24 h de incubação a 25 ºC, induziu a produção de violaceína pela estirpe *C. violaceum* CV026 (Figura 8), confirmando os resultados obtidos no bioensaio em meio sólido. O extrato da cultura *P. fluorescens* 07A não foi capaz de induzir a produção da

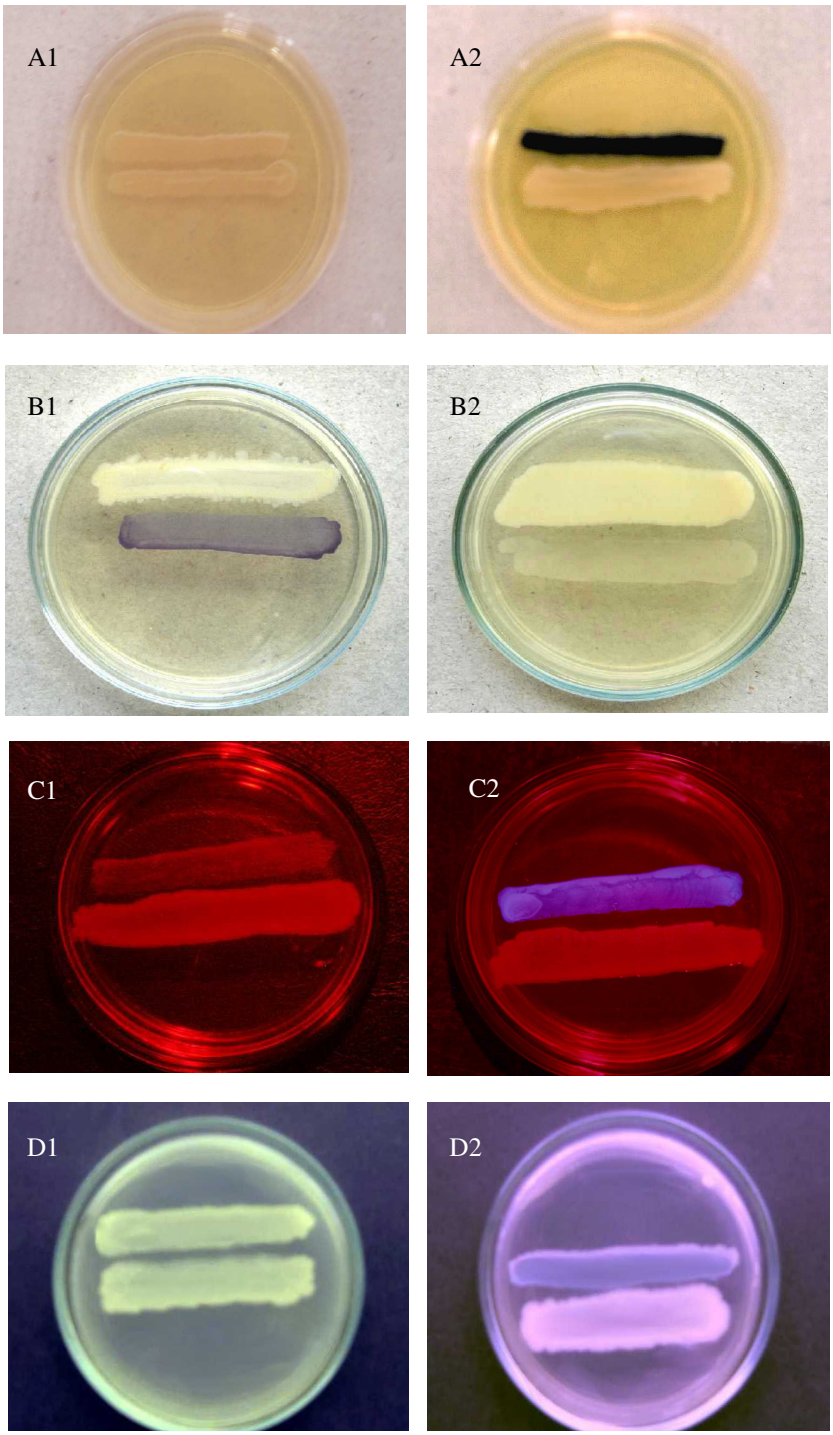


Figura 7 – Sistemas de detecção de bactérias produtoras de AHL. A1, B1, C1 e D1 referem-se aos controles negativos. A1- *C. violaceum* CV026 em paralelo a *C. violaceum* CV026; A2- *C. violaceum* CV026 em paralelo à estirpe *S. liquefaciens* 016; B1 and B2 referem-se ao bioensaio de inibição da produção de violaceína em ágar LB suplementado com 75 nM de HHL para a estirpe *C. violaceum* CV026, B1- *C. violaceum* CV026 em paralelo a *S. liquefaciens* 039; B2- *C. violaceum* CV026 em paralelo a *P. aeruginosa* ATCC 15442; C1- *E. coli* pSB403 em paralelo com *E. coli* pSB403; C2- *E. coli* pSB403 em paralelo com a *S. liquefaciens* 016; D1- *A. tumefaciens* A136 em paralelo a *A. tumefaciens* A136; D2- *A. tumefaciens* A136 em paralelo a *P. fluorescens* 07A.

pigmentação roxa em *C. violaceum* CV026 (Figura 8), nem a produção de β-Gal pela estirpe indicadora *A. tumefaciens* A136. Este resultado pode indicar que a quantidade de AHL presente no extrato não foi suficiente para ativar a transcrição de β-Gal na bactéria indicadora. Resultados semelhantes foram obtidos por Laue et al. (2000) com *P. fluorescens* F113 e por El-Sayed, Hothersall e Thomas (2001) com *P. fluorescens* NCIMB 10586 usando a estirpe *C. violaceum* CV026. Segundo El-Sayed, Hothersall e Thomas (2001), a estirpe NCIMB 10586 podia não produzir uma AHL apropriada para induzir a produção de violaceína por CV026, ou então a AHL estava sendo produzida ou extraída a uma concentração abaixo daquela necessária para ativar a estirpe biosensora, ou compostos adicionais estavam sendo extraídos com atividade inibitória sobre a mesma.

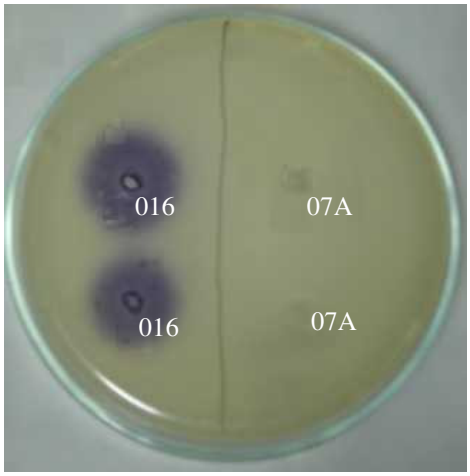


Figura 8 - Bioensaio em placa, utilizando a estirpe *C. violaceum* CV026, para detecção de AHL nos extratos das culturas de *S. liquefaciens* 016 e *P. fluorescens* 07A.

Como não foi possível verificar a presença de AHL no extrato da cultura *P. fluorescens* 07A em meio LB, utilizando as estirpes monitoras *C. violaceum* CV026 e *A. tumefacinens* A136, foi realizado um novo experimento para a verificação da produção de AHL em meio líquido, no sobrenadante da cultura em meio AT. Neste experimento, foi comparada a eficiência de três estirpes de *A. tumefaciens* monitoras para detecção de AHL por indução da produção da enzima β-Gal. Observou-se que apenas a estirpe monitora *A. tumefaciens* KYC55 foi capaz de detectar a presença de AHL produzida por *P. fluorescens* 07A em meio líquido AT (Figura 9).

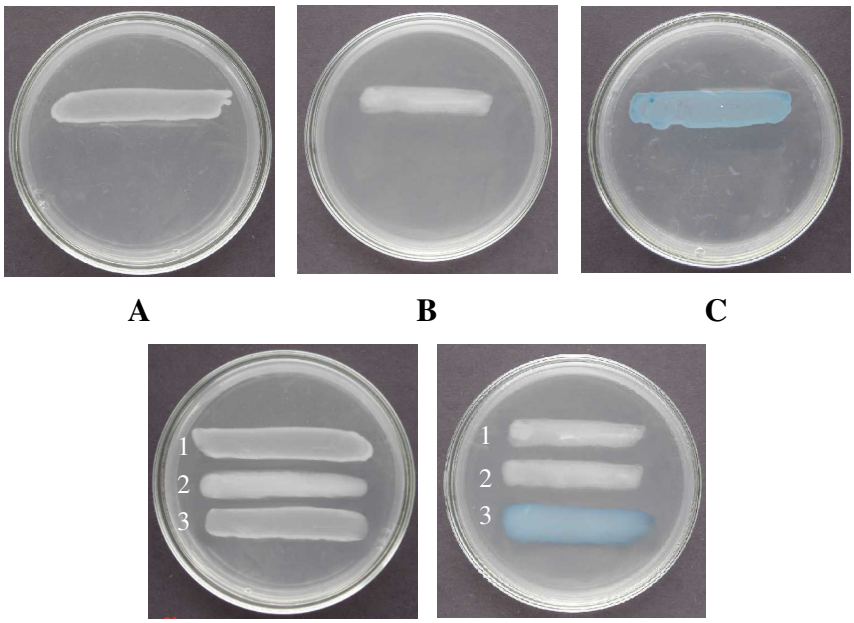


Figura 9 – Bioensaio para detecção de AHL em sobrenadante da cultura de *P. fluorescens* 07A. A indução da produção de β-Gal é indicada pelo surgimento de coloração azul, pelas estirpes monitoras *A. tumefaciens* A136; WCF47; e KYC55 em função da presença de AHL(s) no sobrenadante da cultura de *P. fluorescens* 07A, ou de HHL na concentração de 75 nM adicionada ao meio como controle positivo após 45 h de incubação a 25 ºC. A,B,C são as estirpes A136, WCF47 e KYC55 respectivamente, inoculadas em meio AT com sobrenadante esterilizado da cultura 07A; D- Meio AT adicionado de 0,1 mL de água esterilizada como controle negativo; E- Meio AT adicionado de 75 nM de HHL. 1- *A. tumefaciens* A136; 2- *A. tumefaciens* WCF47; 3- *A. tumefaciens* KYC55.

Verificou-se que as estirpes monitoras *A. tumefaciens* A136 e WCF47 não responderam à presença de AHL nem no sobrenadante da cultura de *P. fluorescens* 07A, nem no controle positivo do experimento, utilizando 75 nM de HHL (Figura 9). Este resultado evidencia a necessidade do uso de mais de uma estirpe monitora em experimentos de detecção de isolados produtores de AHL. Ravn et al. (2001) também consideraram que é necessário o uso de mais de uma estirpe monitora para a detecção de produtores de AHL. A não detecção de 75 nM de HHL por estas estirpes indica uma baixa sensibilidade destes monitores à molécula sinalizadora. Zhu et al. (2003), comparando as estirpes KYC55 e WCF47, verificaram que nem mesmo uma concentração de 5 μM de HHL foi suficiente para ativar completamente a síntese de β-gal pela estirpe WCF47. Esses mesmos autores verificaram que uma concentração de apenas 5 nM de HHL foi suficiente para uma indução detectável pelo monitor KYC55.

Os autores sugeriram que a super expressão da proteína ativadora transcricional TraR, pela estirpe KYC55, aumenta o potencial de detectar AHL.

O procedimento para detecção de AHL em sobrenadante da cultura, utilizando a estirpe monitora KYC55, mostrou-se bastante eficaz e de fácil realização, sendo uma alternativa aos métodos convencionais descritos na literatura. Outra vantagem do método, desenvolvido neste trabalho, é que não é necessário a extração de AHL, o que torna o procedimento mais rápido e econômico.

A constatação de que *P. fluorescens* 07A também produz moléculas sinalizadoras em meio líquido levou à verificação da presença de AHL em extratos obtidos da cultura após 14 h e 18 h de incubação, a 25 ºC, sob agitação em meio LB. Neste experimento foi utilizada apenas a estirpe monitora *A. tumefaciens* KYC55 por ser a única capaz de detectar AHL, em meio líquido, produzida por *P. fluorescens* 07A, conforme demostrado anteriormente. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Constatou-se diferença na produção de β-Gal, baseada na formação de pigmentação azulada nas colônias de *A. tumefaciens* KYC55, entre o extrato obtido após 14 h e 18 h de incubação. Este resultado indicou que a produção de AHL pode ter diminuído com o tempo de incubação ou que as moléculas indutoras produzidas poderiam estar sendo degradadas após 18 h de incubação em LB. Comportamento semelhante de degradação de moléculas indutoras foi observado em *A. tumefaciens*. Neste microrganismo existe um controle genético de ativação e degradação da molécula indutora, conforme verificado por Zhang, Wang e Zhang (2002). Uma enzima, codificada pelo gene *attM*, inativa o anel lactona e sua expressão é aumentada substancialmente quando as células de *A. tumefaciens* entram na fase estacionária. A função desta enzima é degradar o sinal (OHHL) e com isso interromper a conjugação de plasmídeos Ti dependentes de *quorum sensing* (Zhang, Wang e Zhang, 2002).

Após 60 h de incubação, foi constatada a indução da produção de β-Gal na cultura de *A. tumefaciens* KYC55, mesmo na ausência de AHL (Tabela 5). Este resultado pode ser em decorrência da super expressão de TraR (Zhu et al., 2003), a proteína reguladora transcricional, que pode estar ativando o gene da β-galactosidase a níveis basais. Os resultados indicaram que este bioensaio apresenta potencial para a detecção de AHL em extratos de células produtoras de autoindutores por períodos de até 45 h de incubação.

Tabela 5 – Indução da produção de β-Gal em *A. tumefaciens* KYC55 em ágar AT por extratos de *P. fluorescens* 07A obtidos em caldo LB por 14 e 18 h de incubação. O resultado foi baseado na constatação visual da intensidade da coloração azul produzida pela estirpe KYC55, variando de negativo (-) a fortemente positivo (+ + + + +). O controle negativo consistiu do ágar AT adicionado de 0,1 mL de água destilada e o controle positivo consistiu do ágar AT adicionado de 75 nM de HHL.

Tempo de incubação (h)	Controle negativo	Controle positivo	Extrato 14 h	Extrato 18 h
18	-	+	-	-
32	-	+ + +	+	+
42	-	+ + + +	+ +	+
45	-	+ + + +	+ + + +	+ + +
60	+ +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +

4.3. Produção de AHL por *P. fluorescens* 07A em MMS e TYEP + $CaCl_2$

A produção de AHL pelo isolado *P. fluorescens* 07A foi acompanhada durante o crescimento da cultura nos meios de cultivo MMS e TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % a partir de 13 h de incubação. O crescimento e a produção de AHL por *P. fluorescens* 07A foi menor em MMS do que em TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % (Figura 10 e 11). Embora o número de UFC mL^{-1} tenha alcançado valores acima de 10^9 em MMS, após 80 h de incubação, a produção de AHL, medida como atividade de β-Gal, não ultrapassou 500 UM, enquanto, com uma mesma densidade populacional em meio TYEP + $CaCl_2$, a atividade de β-Gal alcançou valores superiores a 1 300 UM (Figura 10 e 11). Entretanto, constatou-se que, na fase estacionária de crescimento de *P. fluorescens* 07A, em meio TYEP + $CaCl_2$ houve um decréscimo acentudado na concentração de AHL no meio de cultura (Figura 11). Esta redução da AHL pode ser atribuída à inativação pelo pH alcalino do meio TYEP + $CaCl_2$ que alcançou o valor de 8,5 após 80 h de incubação. Dados da literatura indicam que moléculas de AHL são sensíveis a tratamentos alcalinos. Eberhard et al. (1981) verificaram que o autoindutor OHHL de *V. fisheri* era estável ao aquecimento de até 100 ºC por 10 min em solução aquosa,

porém a molécula foi totalmente inativada em pH 12 na temperatura ambiente pelo mesmo período. Neste trabalho, a purificação do autoindutor foi possível evitando qualquer exposição da molécula a condições de alcalinidade as quais o anel lactona é sensível. Zhu et al. (1998) verificaram que dois autoindutores sintéticos foram totalmente inativados sob condições de alcalinidade.

Existe também a possibilidade de um controle de inativação destas moléculas sinalizadoras pela própria bactéria. Segundo Zhang, Wang e Zhang (2002) a produção de 3-oxo-C8-AHL (OOHL) por *A. tumefaciens* é dependente da fase de crescimento e a sua concentração é reduzida quando a cultura atinge a fase estacionária. A explicação para este fenômeno reside no fato de que a bactéria expressa uma enzima homóloga a lactonase AiiA de *Bacillus* spp. quando as células entram na fase estacionária de crescimento. As células saem da fase *quorum sensing* por degradarem a molécula sinalizadora, terminando a conjugação de plasmídeos Ti relacionada ao *quorum sensing*.

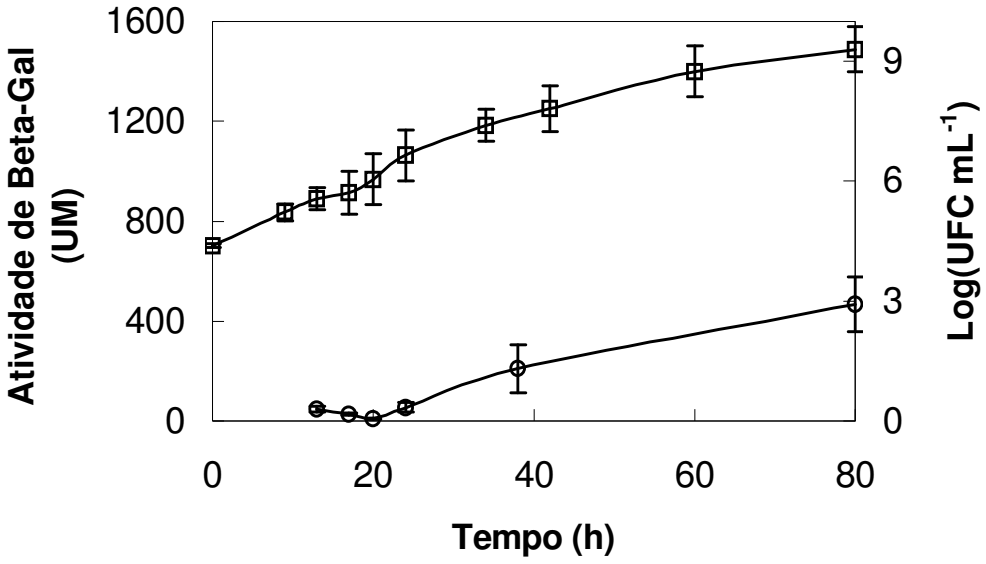


Figura 10 – Produção de AHL em MMS. Curva de crescimento e atividade de β-Gal, medida em Unidades Miller (UM), que determina a produção de AHL por *P. fluorescens* 07A em MMS com incubação a 22 ºC, sob agitação de 150 RPM. AHL, determinada por atividade de β-Gal, -○-; crescimento Log UFC mL^{-1} -□-.

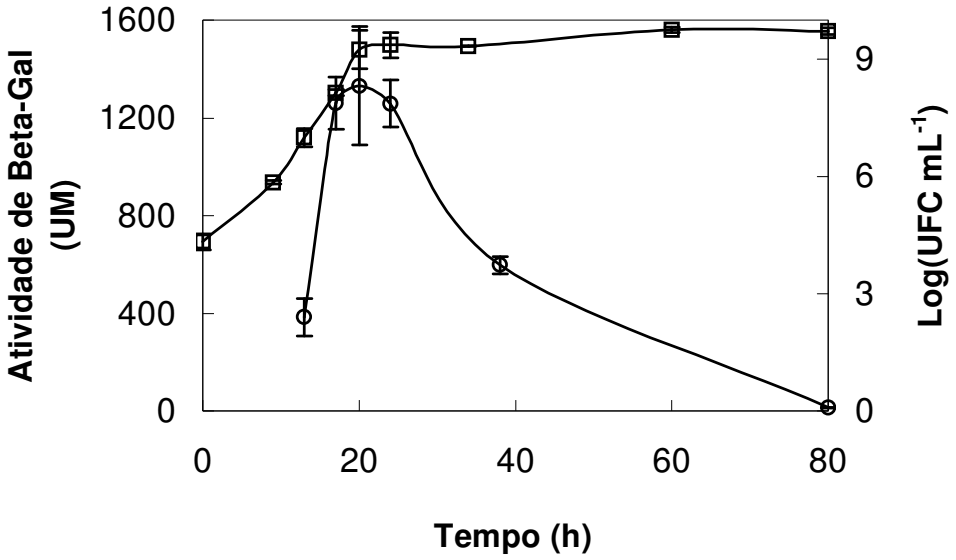


Figura 11 – Produção de AHL em TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. Curva de crescimento e atividade de β-Gal, medida em Unidades Miller (UM), que determina a produção de AHL por *P. fluorescens* 07A em TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % com incubação a 22 ºC sob agitação de 150 RPM. AHL, determinada por atividade de β-Gal, -○-; crescimento Log UFC mL^{-1} -□-.

Associando a dinâmica de produção de AHL ao crescimento da cultura 07A, pode-se inferir se a produção de AHL está sob controle de autoindução. Em MMS, houve um aumento na produção de AHL durante a fase exponencial (Figura 10). Em TYEP + $CaCl_2$, a produção máxima ocorreu no final da fase exponencial (Figura 11). Nealson, Platt e Hastings (1970) verificaram um pico na produção de luciferase antes que a cultura atingisse a fase estacionária e definiram este processo como sendo autoindução. Outros estudos demonstraram que a produção de AHL em *V. fisheri* é regulada por autoindução, uma vez que o gene *luxI* faz parte de um grupo de genes regulados por *quorum sensing* (Whitehead et al., 2001), gerando um *feedback* positivo para síntese da molécula sinal OHHL (Figura 3). Cui (2004) relatou que a produção de AHL por *P. fluorescens* 5064 apresentou uma fase lag durante o início e meio da fase exponencial de crescimento, seguida por um rápido aumento durante o final da fase exponencial. O autor sugeriu que o gene responsável pela sintase de AHL (homólogo a *luxI*) poderia também estar sob controle de autoindução.

4.4. Crescimento e atividade proteolítica do isolado *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo

O crescimento de *P. fluorescens* 07A por 80 h de incubação a 22 ºC sob agitação de 150 RPM foi semelhante em cinco dos seis meios de cultivo avaliados. Exceção é feita para o crescimento em MMS, que ocorreu em uma menor velocidade (Figura 12).

Embora o crescimento de *P. fluorescens* não tenha variado nos meios contendo triptona e no LDR 12 %, a atividade proteolítica foi afetada pela composição do substrato (Figura 12). A adição de 0,25 % de $CaCl_2$ ao meio TYEP aumentou em até 100 % a atividade proteolítica (Figura 12). Em MMS, a atividade proteolítica foi detectada apenas após 34 h de incubação, em virtude da menor velocidade de crescimento da cultura neste meio. Uma maior produção de proteases em meio suplementado com cálcio também foi verificada por Liao e McCallus (1998) e Rajmohan, Dood e Waites (2002). Segundo Liao e McCallus (1998), uma relação linear entre a quantidade de enzima produzida e a concentração de $CaCl_2$ foi observada para a estirpe *P. fluorescens* CY091, sendo a maior atividade proteolítica detectada na concentração de 0,35 mM de $CaCl_2$. Os autores também verificaram que íons Ca^{+2} eram necessários para a atividade ótima da enzima, designada AprX. Eles concluíram que não era claro se os íons Ca^{+2} estavam diretamente envolvidos na regulação da produção de AprX ou simplesmente na estabilização da enzima após a sua síntese.

A adição dos açúcares glicose e lactose não alterou a atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A (Figura 12). A atividade enzimática foi detectada antes que toda a glicose do meio fosse consumida (Figura 12 e 13). Malik, Prasad e Mathur (1985) verificaram uma redução na atividade proteolítica de *Pseudomonas* sp. B-25 em meio TYEP suplementado com açúcares. Foi sugerido que os açúcares exerciam efeito inibitório na produção de proteases no isolado B-25. Jaspe et al. (1994) verificaram que a adição de 6 mM de galactose e 10 mM de lactato ao leite não alterou o crescimento de uma estirpe de *P. fluorescens* e a atividade proteolítica variou pouco. Os autores concluíram que estes compostos não eram responsáveis por repressão catabólica da síntese de proteases em *P. fluorescens*. Verificaram que a adição de 9 mM de glicose ao

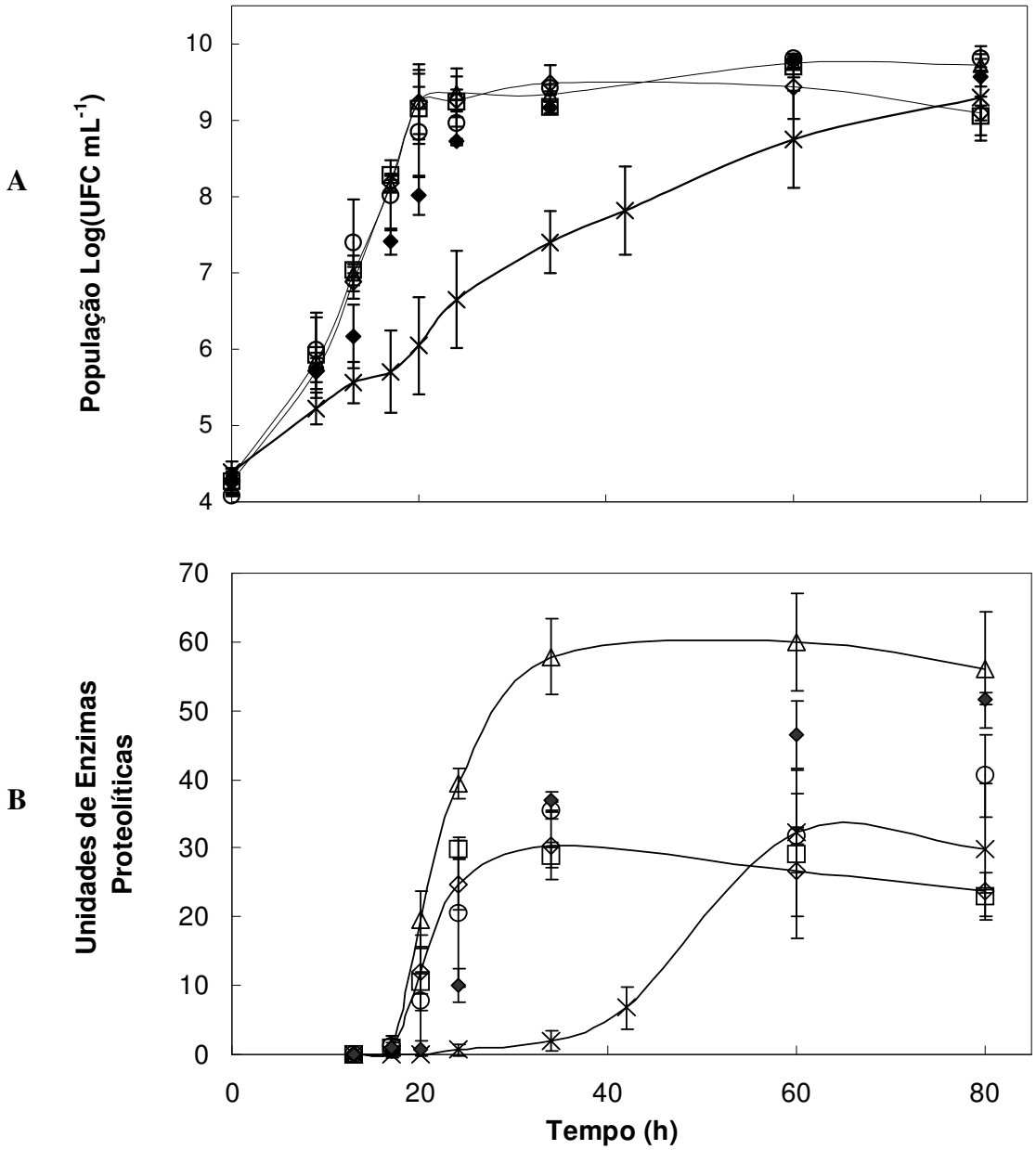


Figura 12 – Crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo. A- Curva de Crescimento (UFC mL^{-1}) e; B- Atividade proteolítica (Unidades de enzimas proteolíticas) de *P. fluorescens* 07A em TYEP -◇- (Triptona 1 %, Extrato de levedura 0,5 %, KH_2PO_4 0,1 % e K_2HPO_4 0,1 %); TYEP + Lactose 0,5 % □; TYEP + Glicose 0,5 % ○; TYEP + $CaCl_2$ 0,25 % -Δ-; MMS (K_2HPO_4 0,7 %, KH_2PO_4 0,2 %, $MgSO_4.7H_2O$ 0,02 %, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 %, Glicerol 0,4 %, $CaCl_2$ 1 mM) -✕-; Leite desnatado reconstituído 12 % (LDR 12 %) ♦.
Uma unidade de enzima proteolítica foi definida como o aumento de 0,01 unidade na absorbância a 366 nm.

leite retardou a produção de proteases; porém, a produção destas enzimas teve início antes do consumo total de glicose. A discrepância entre os resultados obtidos neste estudo e aqueles citados anteriormente, pode ser atribuída a diferenças entre as estirpes utilizadas nos experimentos ou à metodologia de detecção da atividade proteolítica. Além disso, o meio TYEP é relativamente rico não foi possível detectar nenhuma diferença no perfil de crescimento do isolado 07A entre este meio e aqueles suplementados com glicose, lactose ou $CaCl_2$ (Figura 12). Segundo McCarthy (2003), fontes de carbono têm um efeito complexo na síntese de enzimas. A glicose usualmente reprime a síntese de enzimas extracelulares em *Pseudomonas* sp., mas possui efeito estimulador em meios a base de peptona (McKeller, 1989 e McKay, 1994, citados por McCarthy, 2003).

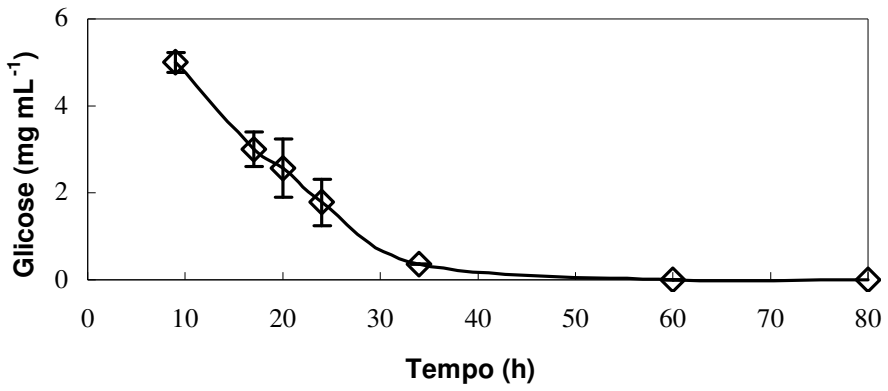


Figura 13 - Consumo de glicose durante o crescimento de *P. fluorescens* 07A em TYEP + glicose 0,5 %, a 22 ºC, sob agitação de 150 RPM.

A presença de lactose no meio TYEP não alterou o crescimento e a produção de proteases, porque bactérias do gênero *Pseudomonas* não metabolizam lactose. Houve uma produção significativa de proteases em LDR 12 % (Figura 12), e o crescimento neste meio foi semelhante aqueles a base de triptona. Estes resultados confirmaram que o leite constitui um meio de cultura ideal para o crescimento de microrganismos (Frank, 1997).

Nas condições experimentais empregadas neste estudo, a produção de proteases foi dependente de uma densidade populacional alta (Figura 14), indicando que

este fenótipo na célula pode ser regulado por *quorum sensing*. Observou-se ainda que a produção de proteases é dependente do meio de cultivo do microrganismo (Figura 14).

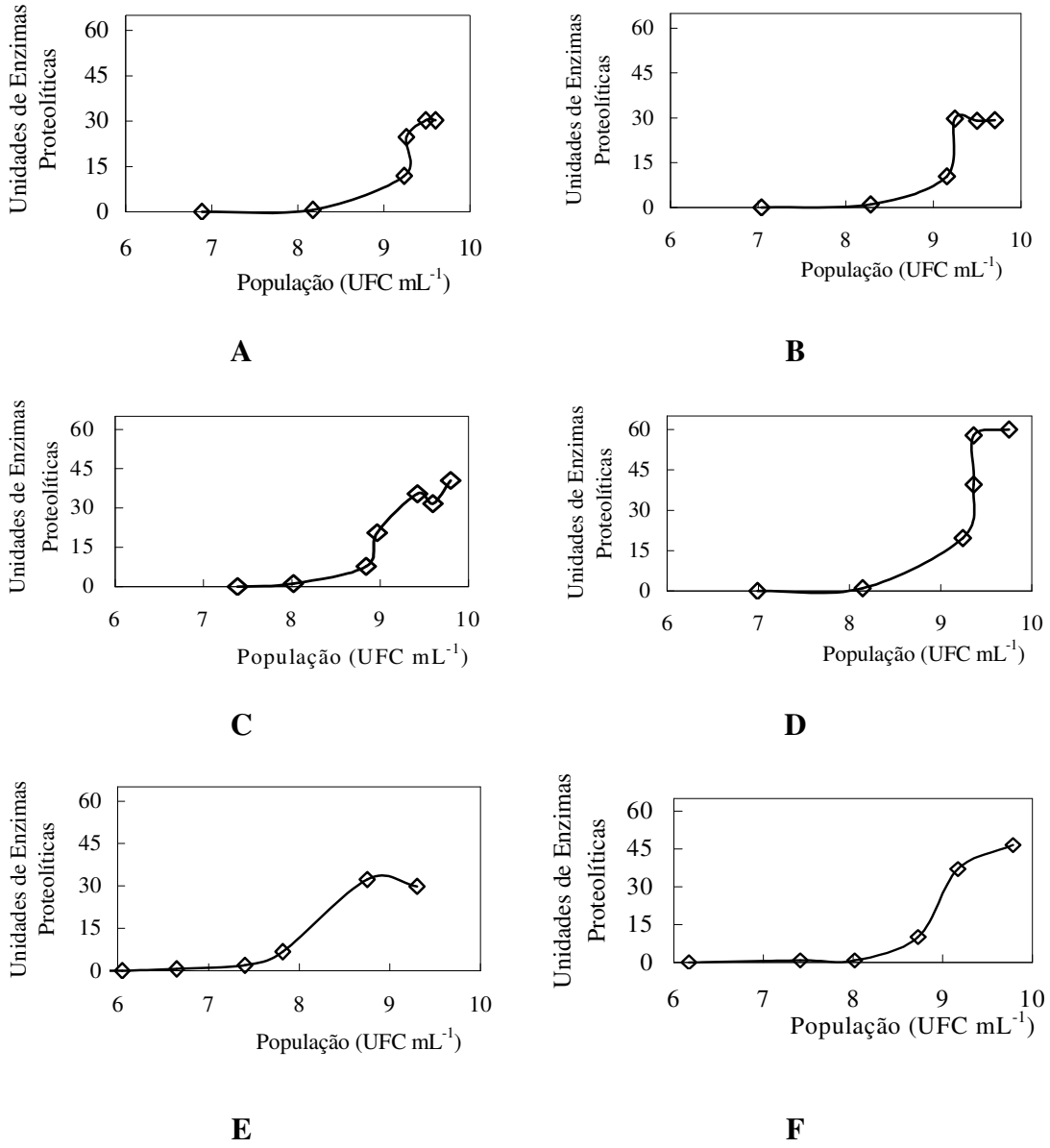


Figura 14 - Atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo e sua relação com a densidade populacional. A- TYEP; B- TYEP + Lactose 0,5 %; C- TYEP + Glicose 0,5 %; D- TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %; E- MMS; F- LDR 12 %.

A produção de proteases em MMS foi detectada em uma densidade populacional cerca de 10 vezes menor do que para nos demais meios de cultura, indicando que a célula pode estar sintetizando mais proteases para permitir melhor

adaptação às condições ambientais. No MMS a atividade proteolítica foi detectada no meio da fase logarítmica de crescimento, enquanto que nos demais meios de cultura, foi detectada apenas ao final desta fase (Figura 12). Segundo Cousin (1982), as proteases extracelulares são produzidas com o intuito de fornecer fonte de carbono para o crescimento celular e não aminoácidos para a síntese de proteínas. Assim, a célula pode estar sintetizando mais proteases, em uma mesma densidade populacional menor em MMS, para compensar a escassez de nutrientes. A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, principalmente quando a densidade populacional é alta, garante que os produtos de hidrólise estejam próximos às células e assim, mais disponíveis para o catabolismo (Whan, Dunstall e Rowe, 2000). Comportamentos semelhantes têm sido observados em outras bactérias, como *Erwinia carotovora* que sintetiza exoenzimas para degradação de parede celular de plantas e *P. aeruginosa* que sintetiza vários fatores de virulência sob condições de altas densidades populacionais (Shapiro, 1998). Segundo McCarthy (2003), a produção de enzimas extracelulares pode não ser vantajosa a baixas densidades populacionais pela difusão destas e dos nutrientes liberados pela sua ação. Como a fase estacionária pode ocorrer em densidades populacionais baixas, o *quorum sensing* poderia prover um sinal mais eficiente para a ativação da produção destas enzimas do que o início da fase estacionária (McCarthy, 2003).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram relatados por Matselis e Roussis (1998) ao verificarem que a atividade proteolítica de *P. fluorescens* MR1 em leite desnatado ocorreu no final da fase logarítmica de crescimento, quando a densidade populacional era de 10^8 UFC mL^{-1} a 10^9 UFC mL^{-1}. Griffiths (1989) avaliando o crescimento de *P. fluorescens* em leite a diferentes temperaturas de incubação, verificou que a atividade proteolítica não foi detectada até que as células atingissem o final da fase exponencial ou o início da fase estacionária de crescimento, sendo que na maioria dos casos as proteases eram produzidas quando as contagens atingiam o mínimo de 3,2 x 10^7 UFC mL^{-1}. Em trabalho realizado por Costa et al. (2002), foi constatado aumento considerável na atividade proteolítica por *P. fluorescens* em leite estocado a 6 ºC quando a população era de, aproximadamente, 10^7 UFC mL^{-1}. Os autores verificaram que a protease bacteriana estava associada à membrana plasmática. Pinto (2004), ao avaliar o efeito do crescimento de *P. fluorescens* 07A e 041 em LDR 12 %, verificou a atividade proteolítica apenas quando a cultura atingiu populações de 10^8 UFC mL^{-1}, inclusive nas temperaturas de 2 ºC e 4 ºC. Foi constatada

a diminuição da estabilidade térmica do leite durante tratamentos térmicos correspondentes à pasteurização rápida quando a população de *P. fluorescens* era superior a 10^7 UFC mL^{-1}. Outros trabalhos também confirmam detecção da atividade de proteases somente em altas densidades populacionais (Law, 1979; Cousin, 1982; Malik, Prasad e Mathur, 1985; Kohlmann et al., 1991; Sørhaug e Stepaniak, 1997; Costa et al., 2001; Rajmohan, Dood e Waites, 2002).

4.5. Determinação do pH e fluorescência dos meios

O pH dos meios de cultura foi avaliado ao final do crescimento e apresentou-se estável apenas em MMS e LDR 12 % (Tabela 6). Nos meios a base de triptona, houve aumento considerável nos valores de pH, além da produção de fortes odores, confirmando os resultados de Villafafila et al. (1993) em caldo nutriente. Segundo estes autores, este efeito pode ter ocorrido em razão da alta concentração de aminoácidos nos componentes do extrato de levedura e peptona usados na formulação do meio de crescimento. A atividade de descarboxilases de *P. fluorescens,* em meio com alta concentração de aminoácidos, resultou na formação de concentrações altas de aminas e, conseqüentemente, no aumento do pH.

A manutenção do valor do pH do MMS próximo a neutralidade pode ser explicada pelo uso de glicerol como fonte de carbono e pela presença de sistema tamponante neste meio. Não houve grande alteração do pH em LDR 12 % em razão do poder tamponante elevado deste meio, conferido pela presença de fosfatos, carbonatos, citratos e proteínas (Walstra e Jennes, 1984).

Tabela 6 – Valores de pH dos meios de cultura no início (0 h) e após o crescimento de *P. fluorescens* 07A por 80 h de incubação a 22 ºC e 150 RPM.

Meios	TYEP	TYEP + 0,25 % Lactose	TYEP + 0,5 % Glicose	TYEP + 0,25 % $CaCl_2$	MMS	LDR
pH inicial	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	6,30
pH final	8,72 ± 0,15	8,76 ± 0,15	8,4 ± 0,14	8,48 ± 0,19	6,74 ± 0,04	7,31 ± 0,37

A intensidade da fluorescência na cultura de *P. fluorescens* 07A foi avaliada ao final do crescimento em todos os meios estudados e, aparentemente, foi maior naqueles

com presença de cálcio (TYEP + $CaCL_2$ 0,25 %, LDR 12 %, MMS) e em TYEP + glicose 0,5 %, (Figura 15).

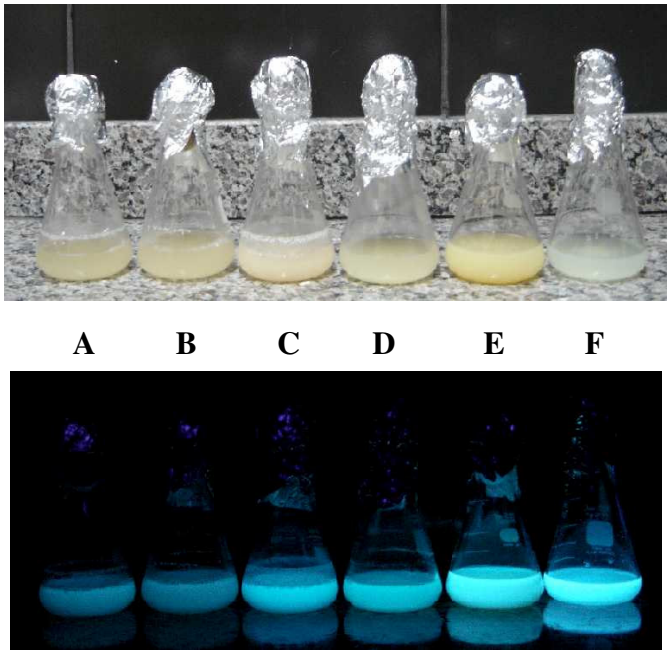


Figura 15 - Produção de pigmentação fluorescente por *P. fluorescens* 07A em diferentes meios de cultivo após 80 h de incubação, a 22 ºC, sob agitação de 150 RPM. A- TYEP; B- TYEP + 0,5 % de lactose; C- TYEP + 0,5 % de glicose; D- TYEP + 0,25 % de $CaCl_2$; E- LDR 12 % e F- MMS.

A fluorescência em várias espécies de *Pseudomonas* é resultante da produção do sideróforo pioverdina, também conhecido como pseudobactina, uma molécula quelante de ferro (Poole e McKay, 2003). Segundo estes autores, a produção de pioverdina em *P. aeruginosa* aumenta em resposta à limitação de ferro no ambiente, o que resulta em ativação da expressão dos genes que codificam a sua biossíntese. A captura de ferro por sideróforos apresenta função importante no crescimento e na sobrevivência das bactérias no ambiente e é crucial para a virulência de organismos patogênicos (Poole e McKay, 2003). Recentemente, Lamont et al. (2002) demonstraram que, além da função de capturar ferro, o sideróforo pioverdina, em *P. aeruginosa*, regula a produção de, pelo menos, três fatores de virulência. O sideróforo atua como uma molécula sinalizadora controlando a sua própria produção e a de proteínas secretadas pela célula. Os autores sugeriram que, em função da produção comum de sideróforos entre bactérias, é possível que estas moléculas também atuem como sinalizadores para controlar a expressão gênica em outras espécies.

4.6. Efeito da adição de ABL e HHL no crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A

Os autoindutores sintéticos ABL (α-amino butiro lactona) e HHL (N-hexanoil homoserina lactona) adicionados à cultura de *P. fluorescens* 07A não exerceram efeito sobre o crescimento nem sobre a atividade proteolítica (Figura 16). Estes resultados sugerem que estas moléculas de quatro e seis carbanos de cadeia lateral, sem substituições, não estão envolvidas na regulação da atividade proteolítica deste isolado, sob as condições experimentais avaliadas.

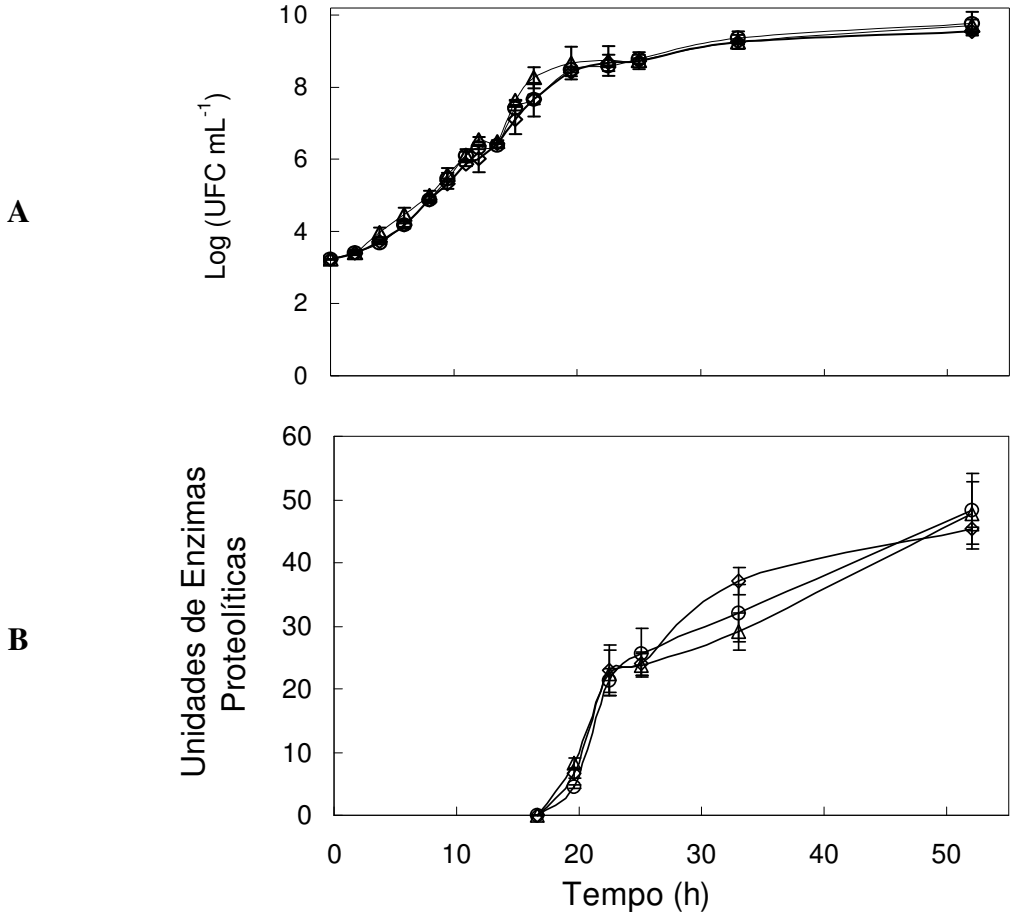


Figura 16 – Efeito da adição de ABL e HHL sobre o crescimento e atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A. A- Curva de crescimento e; B- Atividade Proteolítica de *P. fluorescens* 07A. Controle -◊-; ABL -○-; HHL -Δ-.

Entretanto, outros fenótipos em *P. fluorescens* são, comprovadamente, influenciados por AHLs adicionadas ao meio de cultivo. Allison et al. (1998) verificaram que a adição de HHL, na concentração de 4,5 μg mL^{-1} ao meio de cultura

fresco, acelerou e aumentou a formação de biofilme pela estirpe *P. fluorescens* B52. Os autores sugeriram que a adesão e a formação de biofilme em *P. fluorescens* são influenciados pela presença de AHLs. Whan, Dunstall e Rowe (2000) avaliaram o efeito de ABL sobre a cinética de crescimento de dois isolados de *P. fluorescens*. Foi verificada que a adição deste agente reduziu a duração da fase lag, ou de adaptação, e diminuiu a taxa de crescimento exponencial destas estirpes. Os autores concluíram que estes isolados poderiam ser susceptíveis ao fenômeno *quorum sensing*.

4.7. Efeito da adição de extrato de AHL(s) sobre a atividade proteolítica em TYEP + $CaCl_2$

Resultados anteriores demonstraram que a atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A em meio TYEP + $CaCl_2$ foi detectada somente quando uma densidade populacional alta foi alcançada (Figura 14), indicando um possível envolvimento do *quorum sensing* na regulação da produção de proteases. Entretanto, a adição do extrato de AHL obtido de *P. fluorescens* 07A em meio TYEP + $CaCl_2$ contendo populações entre 10^7 UFC mL^{-1} a 10^9 UFC mL^{-1} não resultou em incremento na atividade proteolítica específica em comparação ao controle, sem AHL (Figura 17).

Não houve diferença significativa, ao nível de 5 % de probabilidade pela Análise de variância (ANOVA), entre as médias do controle e do tratamento com extrato, para um mesmo tempo e população inicial. Os valores representam a média de três repetições independentes.

Estes resultados indicam que a produção de proteases por *P. fluorescens* pode não ser influenciada pela presença de moléculas sinalizadoras. Outros trabalhos devem ser realizados para maior entendimento do mecanismo de ação de AHL(s) sobre a produção de proteases, especialmente com a detecção de RNA mensageiro do gene *aprX* que possibilitará um resultado mais apurado da influência de moléculas sinalizadoras na transcrição do gene que codifica a enzima AprX também sob condições de baixa densidade populacional.

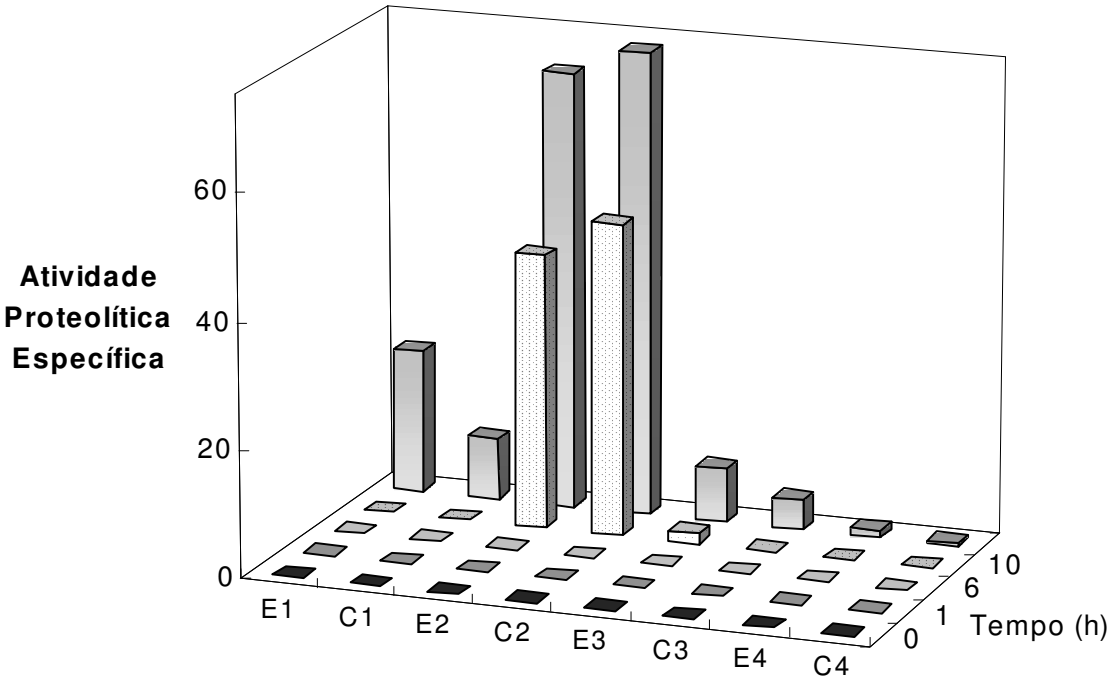


Figura 17 – Efeito da adição do extrato de AHL sobre a atividade proteolítica específica de *P. fluorescens* 07A em TYEP $CaCl_2$ durante 10 h de incubação a 22ºC, sob agitação de 150 RPM. C- Controle, TYEP $CaCl_2$ adicionado de extrato obtido do meio esterilizado. E- Tratamento com extrato, TYEP $CaCl_2$ adicionado de extrato da cultura de *P. fluorescens* 07A. 1- População de inicial de 3,2 x 10^7 UFC mL^{-1}; 2- População inicial de 3,2 x 10^8 UFC mL^{-1}; 3- População inicial de 3,2 x 10^9 UFC mL^{-1}; 4- População inicial de 6,3 x 10^9 UFC mL^{-1}.

Em outras bactérias, tem sido relatado que pode não haver correlação entre a produção de AHL e proteases. É o que ocorreu, por exemplo, com a estirpe *Aeromonas hydrophila* aroA (Vivas et al., 2004). Nesse trabalho, a expressão diferencial dos genes que codificam proteases em densidades populacionais altas foi dependente somente das condições ambientais e não do *quorum sensing*. Bruhn et al. (2004) constataram que a adição de inibidores específicos de *quorum sensing* a uma estirpe de *Hafnia alvei* produtora de AHL não influenciou no perfil de deterioração desta bactéria em carne embalada a vácuo. Foi observado que tanto moléculas de AHL quanto bactérias

produtoras destes sinalizadores estavam presentes na carne durante a estocagem, mas pareciam não influenciar na deterioração deste tipo de produto. Os autores também verificaram que a estirpe *H. alvei* produtora de AHL poderia induzir fenótipos relevantes em outras espécies bacterianas no mesmo ambiente, influenciando a deterioração de produtos alimentícios contaminados com bactérias da família das Enterobacteriaceae.

Entretanto, a regulação da produção de proteases extracelulares por *quorum sensing* foi demonstrada em algumas espécies bacterianas. Em *P. aeruginosa*, a proteína LasR, um homólogo a LuxR de *V. fisheri*, é ativadora transcricional do gene que codifica para protease alcalina (*apr*). Em *S. proteamaculans* B5A, o *quorum sensing* controla a síntese, de pelo menos, 39 proteínas, incluindo proteases e,ou lipases relacionadas ao processo de deterioração de leite (Christensen et al., 2003). Os autores também demonstraram que o *quorum sensing* está envolvido na produção de características de deterioração *in situ*.

Os resultados deste estudo indicam a necessidade de realização de outros trabalhos que permitam melhor compreensão do mecanismo *quorum sensing* e sua participação na deterioração de produtos alimentícios.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A produção de homoserina lactona acilada foi detectada em 47 de um total de 53 bactérias psicrotróficas proteolíticas Gram-negativas isoladas de leite cru refrigerado, com a utilização de três sistemas monitores, indicando que a natureza química destas moléculas é bastante diferenciada entre os isolados.

A detecção de AHL em extrato da cultura de *S. liquefaciens* 016 foi feita pela estirpe monitora *C. violaceum* CV026. Este monitor não detectou AHL no extrato de *P. fluorescens* 07A. Isolados de *P. fluorescens* foram capazes de ativar a produção da enzima β-Gal no monitor *A. tumefaciens* A136 quando cultivados em ágar LB. Entretanto, a detecção de AHL em extrato da cultura de *P. fluorescens* só foi possível com a utilização da estirpe monitora de *A. tumefaciens* KYC55 mais sensível. O procedimento adotado, com a adição do extrato no ágar AT, inoculado com as estirpes monitoras, mostrou-se eficaz e de fácil realização, apresentando-se como uma alternativa às metodologias tradicionais de detecção de AHL.

A produção de AHL pelo isolado 07A atingiu uma concentração máxima no final da fase logarítmica e no início da fase estacionária máxima de crescimento em meio TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. No decorrer da fase estacionária, a concentração de AHL foi reduzida, indicando uma provável degradação da molécula em função do pH alcalino. Pode-se sugerir também a existência de uma regulação da produção destas moléculas de uma forma dependente da fase de crescimento celular. A AHL de *P. fluorescens* 07A foi detectada em MMS no início da fase logarítmica de crescimento e

concentrações máximas foram registradas ao final do período de incubação de 80 h. A concentração de AHL(s) no MMS foi cerca de três vezes menor que no meio TYEP + $CaCl_2$ e, am ambos os meios a população final foi de 10^9 UFC mL^{-1}. Os resultados indicaram que a produção de AHL pode estar sob controle de autoindução.

O crescimento e a atividade proteolítica de *P. fluorescens* 07A foram avaliados em seis meios de cultura e apenas, em MMS foi verificada uma redução acentuada na velocidade do crescimento bacteriano. Constatou-se que a adição de 0,25 % de cálcio ao meio TYEP promoveu o aumento da atividade proteolítica de até 100 %. O cálcio pode estar aumentando a síntese das proteases ou a estabilidade destas enzimas.

O pH dos meios de cultura a base de triptona aumentou na fase estacionária de crescimento em virtude de uma maior proteólise dos substratos protéicos, com liberação de aminas para o meio. Em conseqüência da presença de um sistema tampão natural no leite, o pH em LDR 12 % variou de 6,3 para 7,3. A ausência de substratos protéicos para as enzimas proteolíticas pode explicar a manutenção do pH próximo a 7,0 no MMS.

A produção do sideróforo pioverdina, por *P. fluorescens* 07A, caracterizada pela intensidade da pigmentação fluorescente, foi maior em meios com cálcio e reflete a necessidade de capturar ferro pelo microrganismo.

A adição dos indutores sintéticos ABL ou HHL ao meio de cultivo não afetou o crescimento e a atividade proteolítica da estirpe 07A em TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %, sugerindo que estas moléculas não participam da regulação do crescimento e da produção de proteases neste isolado. A adição do extrato de AHL, obtido da cultura da mesma estirpe em fase logarítmica de crescimento, não aumentou a atividade proteolítica específica desta bactéria em TYEP + $CaCl_2$ 0,25 %. Este resultado é um indicativo de que o *quorum sensing* pode não estar exercendo influencia na regulação da síntese de enzimas proteolíticas pela estirpe *P. fluorescens* 07A.

Considerando que a presença de AHLs foi freqüente entre os isolados de leite e que o *quorum sensing* tem implicações importantes na ecologia microbiana de produtos alimentícios, com a participação na regulação de fenótipos relacionados à deterioração em bactérias saprofíticas, sugere-se a condução de trabalhos futuros para uma maior compreensão do envolvimento deste sistema de regulação com a deterioração de produtos alimentícios. Uma vez estabelecida esta relação, novas formas de controle microbiano, por moléculas que interfiram com o mecanismo *quorum sensing*, devem ser estudadas para o desenvolvimento de novas técnicas de preservação de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BASSLER, B.L.; WRIGHT, M.; SHOWALTER, R.E.; SILVERMAN, M.R. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. **Molecular Microbiology**, v.9, p. 773-786, 1993.

BAUER, W.D.; ROBINSON, J.B. Disruption of bacterial *quorum sensing* by other organisms. **Current opinion in Biotechnology**, v.13, p.234-237, 2002.

BRINT, J.M.; OHMAN, D.E. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.7155-7163, 1995.

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

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

CHAPON-HERVE, V.; AKRIM, M.; LATIFI, A.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M. Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa.* **Molecular Microbiology**, v.24, p.1169-1178, 1997.

CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B.L.; HUGHSON, F.M. Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. **Nature**, v.415, p.545-549, 2002.

CHOI, S.H.; GREENBERG, E.P. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene-activating domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v.88, p.1115-1119, 1991.

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.

COSTA, M.; GÓMEZ, M.F.; MOLINA, L.H.; ROMERO, A. Cinética de crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda a temperaturas de refrigeración. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.51, n.4, p.371-375, 2001.

COSTA, M.; GÓMEZ, M.F.; MOLINA, L.H.; SIMPSON, R.R.; ROMERO, A. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.2, p.160-166, 2002.

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

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

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

DE KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Bacterial *quorum sensing* in pathogenic relationships. **Infection and immunology**, v.68, p.4839-4849, 2000.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.130-138, 2003.

DONABEDIAN, H. *Quorum sensing* and its relevance to infectious diseases. **Journal of Infection**, v.46, p.207-214, 2003.

DONG, Y.H.; XU, J.L.; LI, X.Z.; ZHANG, L.H. AiiA, an enzyme that inactivates the acyl homoserine lactone quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.497, p.4154-4158, 2000.

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

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

EBERHARD, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. **Journal of Bacteriology**, v.109, p.1101-1105, 1972.

EBERHARD, A.; BURLINGAME, A.L.; EBERHARD, C.; KENYON, G.L.; NEALSON, K.H.; OPPENHEIMER, N.J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, v.20, p.2444-2449, 1981.

EBERL, L., N-Acyl-homoserine lactone-mediated gene regulation in Gram-negative bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, p.493–506, 1999.

EGLAND, K.A.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. **Molecular Microbiology**, v.31, p.1197-1204, 2001.

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

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

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDEHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurized milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v.8, p.829-834, 1998.

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

ENGEBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, p.4154-4158, 1984.

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.

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

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG,E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.269-275, 1994.

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

FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication. **Annual review of Genetics**, v.35, p.439-468, 2001.

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

GAMBELLO, M.J.; KAYE, S.; IGLEWSKI, B.H. LasR of *Psedomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enharcer of exotocin A expression. **Infection Immunology**, v.61, p.1180-1184, 1993.

GOVAN, J.R.W.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepatia*. **Microbiology Reviews**, v.60, p.539-574, 1996.

GRAF, J.; RUBY, E.G. Host-derived amino acids support the proliferation of symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.1818-1822, 1998.

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

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

GRAY, K.M. Intercellular communication and group behavior in bacteria. **Trends in Microbiology**, v.5, n.5, p.184-188, 1997.

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

GREGORY, E.; MITCHELL, K.; EWINGS, N. Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Research**, v.53, p.97-115, 1986.

GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPS, J.D.; WEST, I.G.; MUIR, D.D. The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. **Food Microbiology**, v.5, p.75-87, 1988.

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

HANZELKA, B.L., GREENBERG, E.P. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fisheri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.815-817, 1995.

HANZELKA, B.L.; STEVENS, A.M.; PARSEK, M.R.; CRONE, T.J.; GREENBERG, E.P. Mutation analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI popypeptide: critical regions of na autoinducer synthase. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.15, p.4882-4887, 1997.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOT, A.J.; DEETH, H.C. Production of protease by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperatures. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.58, p.1, 2003.

HASSETT, DJ.; MA, J.F.; ELKINS, J.G.; MCDERMOTT, T.R.; OCHSNES, U.A.; WEST, S.E.; HUANG, C.T.; FREDERICKS, J.; BURNETT, S.; STEWART, P.S. *Quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biolfim susceptibility to hydrogen peroxide. **Molecular Micriobiology**, v.34, p.1082-1093, 1999.

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

HOLDEN, M.T.G.; CHHABRA, S.R.; NYS, R.; STEAD, P.; BAINTON, N.J.; HILL, P.J.; MANEFIELD, M.; KUMAR, N.; LABATTE, M.; ENGLAND, D.; RICE, S.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G.P.C.; STEWART, G.S.A.B.; BYCROFT, B.W.; KJELLEBERG, S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing crosstalk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Molecular Microbiology**, v.33, p.1254-1266, 1999.

HOLDEN M.T.G.; SWIFT, S.; WILLIAMS, P. New signal molecules on the quorum sensing block. **Trends in Microbiology**, v.8, n.3, p.101-103, 2000.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v.96, n.1, p.23-28, 1990.

JASPE, A.; PALACIOS, P.; MATIAS, P.; FERNANDEZ, L.; SANJOSE, C. Proteinase activity of *Pseudomonas fluorescens* grown in cold milk supplemented with nitrogen and carbon sources. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.923-929, 1994.

KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LADISCH, M.R. Production of proteases by psychrotophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3275-3283, 1991.

KOJIC, M.; DEGRASSI, G.; VENTURI, V. Cloning and characterization of the *rpoS* gene from plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358: RpoS is not involved in siderophore and homoserine lactone production. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1489, p.413-420, 1999.

KOLIBACHUK, D.; GREENBERG, E.P. The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.7307-7312, 1993.

KUMURA, H.; MIKAWA, K.; SAITO, Z. Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Dairy Research**, v.60, p.229-237, 1993.

LAMONT, I.L.; BEARE, P.A.; OCHSNER, U.; VASIL, A.I.; VASIL, M.L. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, p.7072-7077, 2002.

LATIFI, A.; WINSON, M.K.; FOGLINO, M.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.; LAZDUNSKI, A.; WILLIAMS, P. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Molecular Microbiology**, v.17, p.333-343, 1995.

LATIFI, A.; FOGLINO, M.; TANAKA, K.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A. A hierarchical *quorum sensing* cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators *lasR* e *rhIR* (VSMR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. **Molecular Microbiology**, v.21, p.1137-1146, 1996.

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

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

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

LEE, S.J.; PARK, S.Y.; LEE, J.J.; YUM, D.Y.; KOO, B.T.; LEE J.K. Genes encoding the N-acylhomoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.3919-3924, 2002.

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

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 str. XJ12B represents a novel and potent class of quorum quenching enzymes. **Molecular Microbiology**, v.47, p.849-860, 2003.

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

MALIK, R.K.; PRASAD, R.; MATHUR, D.K. Effect of some nutritional and environmental factors on extracellular protease production by *Pseudomonas* sp. B-25. **Lait**, v.65, p.169-183, 1985.

MANEFIELD, M.; WELCH, M.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G.P.C.; KJELLEBERG, S. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwivia carotovora*. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, p.131-138, 2001.

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

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. A comparison of extracellular proteases from three psychrotrophic strains of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of General Applied Microbiology**, v.38, p.209-225, 1992.

MARTINS, M.L. **Diversidade de bactérias psicrotróficas proteolíticas de leite e presença do gene que codifica metaloprotease alcalina**. 51p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MATSELIS, E.; ROUSSIS, I.G. Proteinase and lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. Proteolysis and lipolysis in thermized ewe's milk. **Food Control**, v.9, n.5, p.251-259, 1998.

MCCARTHY, C.N. **Regulatory elements controlling lipase and metalloprotease production in *Pseudomonas fluorescens* B52**. 98p. PhD thesis, School of Health Science, Faculty of Health Sciences, Griffith University, Australia, 2003.

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

MILLER, J. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1972.

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

MILLER, M.B.; SKORUPSKI, K.; LENZ, D.H.; TAYLOR, R.K.; BASSLER, B.L. Parallel *quorum sensing* systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. **Cell**, v.110, p.303-314, 2002.

MORÉ, M.I.; FINGER, L.D.; STRYKER, J.L.; FUQUA, C.; EBERHARD, A.; WINANS, S.C. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. **Science**, v.272, p.1655-1658, 1996.

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

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

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

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Acyl homoserine lactone *quorum sensing* in Gram negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.16, p.8789-8793, 2000.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. *Quorum sensing* signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Methods Enzimology**, v.310, p. 43-55, 1999.

PASSADOR L.; COOK J.M.; GAMBELLO M.J.; RUST L.; IGLEWSKI B.H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, v.260, p.1127-1130, 1993.

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

PESCI, E.C.; MILBANK, J.B.; PEARSON, J.P.; MCKNIGHT, S.; DENDE, A.S.; GREENBERG, E.P.; IGLEWSKI, B.H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.11229-11234, 1999.

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

POOLE, K.; MCKAY, G.A. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: Many roads lead to Rome. **Frontiers in Bioscience**, v.8, p.661-686, 2003.

QUIN, Y.; LUO, Z.Q.; SMYTH, A.J., GAO, P.; BECK VON BODMAN, S.; FARRAND, S. Quorum sensing signal binding results in dimerization of TraR and its

release from membranes into the cytoplasm. **EMBO Journal**, v.19, n.19, p.5212-5221, 2000.

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

RASMUSSEN, T.B.; BJARNSHOLT, T.; SKINDERSOE, M.E.; HENTZER, M.; KRISTOFFERSEN, P.; KÖTE, M.; NIELSEN, J.; EBERL, L.; GIVSKOV, M. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.5, p.1799-1814, 2005.

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

RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on κ-casein. **Journal of Dairy Research**, v.67, p.625-630, 2000.

REN, D.; SIMS, J.J.; WOOD, T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Letters Applied Microbiology**, v.34, p.293-299, 2002.

RICE, S.A.; GIVSKOV, M.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S. Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.1, p.23-31, 1999.

RUBY, E.G. Lessons from a cooperative bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.591-624, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

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

SCHAUDER, S.; BASSLER, B.L. The languages of bacteria. **Genes & development**, v.15, p.1468-1480, 2001.

SEED, P.C.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B.H. Actiovation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas aeruginosa* PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.3, p.654-659, 1995.

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

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

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

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

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. **Food enzymology**, vol. 1 (Fox, P.F., ed.), p.169-218, 1991.

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

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; JARVIS, B.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.8951-8956, 2003.

STEVENS, A.M.; DOLAN, K.M.; GREENBERG, E.P. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.12619-12623, 1994.

STOCK, A.M.; ROBINSON, V.I.; GOUDREAU, P.N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v.69, p.183-215, 2000.

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

SWIFT, S.; WINSON, M.K.; CHAN, P.F.; BAINTON, N.J.; BIRDSALL, M.; REEVES, P.J.; REES, C.E.D.; CHHABRA, S.R.; HILL, P.J.; THROUP, J.P.; BYCROFT, B.W.; SALMOND, G.P.C.; WILLIAMS, P.; STEWART, G.S.A.B. A novel strategy for the isolation of *luxI* homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. **Molecular Microbiology**, v.10, p.511–520, 1993.

SWIFT, S.; DOWNIE, J.A.; WHITEHEAD, N.A.; BRNARD, 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.

TATEDA, C.R.; COMTE, R.; PECHERE, J.C.; KOHLER, T.; YAMAGUCHI, K.; VAN DELDEN, C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, June, p.1930-1933, 2001.

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

THROUP, J.; WINSON, M.K.; BAINTON, N.J.; BYCROFT, B.W.; WILLIAMS, P.; STEWART, G.S.A.B. Signaling in bacteria beyond bioluminescence. In bioluminescence and Chemiluminescence: **Fundametals and applied aspects**, pp. 89-92. Edited by Campbell, A., Kricka, L., Stanley, P. Chichester: Wiley, 1995.

TJALSMA, H.; KOETJE, E.J.; KIEWIET, R.; KUIPERS, O.P.; KOLKMAN, M.; VAN DER LAAN, J.; DASKIN, R.; FERRARI, E.; BRON, S. Engineering of quorum-sensing systems for improved production of alkaline protease by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.569-578, 2004.

TODER, D.S.; FERRELL, S.J.; NEZEZON, J.L.; RUST, L.; IGLEWSKI, R.H. *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. **Infection Immunology**, v.62, p.1320-1327, 1994.

VILLAFAFILA, A.; FRIAS, J.D.; ABAD, P.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, C. Extracellular proteinase activity from psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* biovar 1 (*Ps. fluorescens* NC1). **Milchwissenschaft**, v.489, n.8, p.435-438, 1993.

VIVAS, J.; RAZQUIN, B.E.; LÓPEZ-FIERRO, P.; NAHARRO, G.; VILLENA, A. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in na *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.101, n.3, p.167-176, 2004.

WALSTRA, P.; JENNES, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editorial Acriba, 423p, 1984.

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

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

WHITELEY, M.; LEE, K.M.; Greenberg, E.P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.13904-13909, 1999.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S.S.; RALYEA, R.; BOOR, K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.2085-2095, 2000.

WIKING, L.; FROST, M.B.; LARSEN, L.B.; NIELSEN, J.H. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v.57, n.4, p.190-194, 2002.

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

WINZER, K.; HARDIE, K.R.; WILLIAMS, P. Bacterial cell-to-cell communicarion: sorry, can't talk now – gone to lunch! **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 216-222, 2002.

WITHERS, H.; SIMON, S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as na integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p.186-193, 2001.

WÕSTEN, M.M.S.,M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS Microbiology**, v.22, p.157-150, 1998.

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

ZHANG, H-B.; WANG, L-H.; ZHANG, L-H. Genetic control of quorum sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Early Edition, p.1-6, 2002.

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

ZHU, J.; CHAI, Y.; ZHONG, Z.; LI, S.; WINANS, S.C. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-Acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: Detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6949-6953, 2003.

ANEXO

Meio mínimo AT (Tempé et al., 1977)

Tampão AT 20x:

KH_2PO_4 - 214 g

Adicionar a 1 L de água destilada e ajustar o pH para 7,3 com KOH sólido

Sais AT 20x:

$(NH_4)_2SO_4$ - 40 g

$MgSO_4$ - 1.56 g

$CaCl_2$ - 0.152 g

$FeSO_4$ - $7H_2O$ - 0.100 g

$MnSO_4$ - H_2O - 0.044 g

Adicionar a 1 L de água destilada

Os sais e o tampão não podem ser autoclavados juntos. Após autoclavar os sais, é formado um precipitado rosa. Deve-se tomar o cuidado de agitar antes de usar. Como meio de crescimento, usa-se a concentração de 1x tanto do tampão quanto dos sais e 0,5 % de glicose.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo