

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TOLERÂNCIA DE *Aeromonas* spp. AO ESTRESSE SALINO

EVANISE OLIVESKI DOS SANTOS VISENTINI

Caxias do Sul

2013

EVANISE OLIVESKI DOS SANTOS VISENTINI

TOLERÂNCIA DE *Aeromonas* spp. AO ESTRESSE SALINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Caxias do Sul

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

V829t Visentini, Evanise Oliveski dos Santos, 1977-
Tolerância de Aeromonas spp. ao estresse salino / Evanise Oliveski dos Santos Visentini. - 2013.
xiii, 54 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.

Apresenta bibliografia.

“Orientação: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Longaray Delamare, co-orientador Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray.”

1. Aeromonas – Biotecnologia. 2. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 579.84

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|------------------------------|--------|
| 1. Aeromonas – Biotecnologia | 579.84 |
| 2. Biotecnologia | 57.08 |

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/ 1974

EVANISE OLIVESKI DOS SANTOS VISENTINI

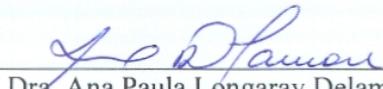
TOLERÂNCIA DE *Aeromonas* spp. AO ESTRESSE SALINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray

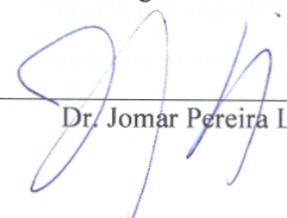
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24 DE MAIO DE 2013.


Dra. Ana Paula Longaray Delamare
Orientadora


Dr. Sergio Echeverrigaray
Co-orientador


Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa


Dra. Ângela Maria Fiorentini


Dr. Jomar Pereira Laurino

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
Sistema de Bibliotecas

DEDICATÓRIA

Dedico,

Este trabalho a Deus que faz tudo possível em minha vida. Ao meu esposo Jean Carlo que com seu amor incondicional esteve em todos os momentos me amparando e me dando força; Que com sua serenidade e sensatez me colocou por muitas vezes no caminho certo, por me aceitar sem restrições e me colocar a frente de seus desejos e ambições. Aos meus pais João Antonio e Amália, ao meu irmão Evandro, que não puderam acompanhar de perto o desenrolar do trabalho, mas que sempre acreditaram e apostaram no meu sucesso... Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fazer entender que tudo nessa vida tem seu tempo, por me dar forças para levantar quando caí e por me iluminar nos momentos mais difíceis, A Maria, mãe de Jesus, que me protege e mostra sempre o melhor caminho a seguir; A Jesus, o grande Mestre.

A toda minha família, que torceu, vibrou e rezou pelo meu sucesso...

A minha orientadora professora Ana Paula Delamare que confiou, apostou e sempre exigiu o melhor de mim, pela oportunidade e disponibilidade para realização deste trabalho, pela compreensão e conhecimentos transmitidos.

Ao meu co-orientador professor Sergio Echeverrigaray pelo seu conhecimento, sabedoria, sugestões e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia, pela amizade e colaboração, em especial as minhas amigas e colegas Franciele Zanol, Angelica Onzi, Ronize dos Santos, Queli Montanari, Valquiria Reis, Fabiola Toniazzo e Andrelise Verzeletti, por viverem comigo cada momento de alegria e de tristeza durante o mestrado, pela amizade verdadeira, ótima convivência e por me darem esperança nos momentos mais difíceis.

Ao Jucimar Zacaria pelas risadas e pelas broncas por dedicar seu tempo em me ajudar a crescer profissionalmente e pela força em muitos momentos difíceis.

A Luciana Touguinha pela amizade, pelos conselhos, por me mostrar que sou capaz e por me fazer entender que nem tudo é do jeito que queremos, mas que com trabalho podemos ter tudo àquilo que desejamos.

Aos professores Jomar Laurino e Mauricio Moura da Silveira por todas as observações, considerações, e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Biotecnologia pelos conhecimentos transmitidos.

A UCS e CNPq pelo auxílio financeiro que foi primordial na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial, ao professor Aldo Dilon e Lucimara Serafini.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE QUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>AEROMONAS</i> E SUAS ESPÉCIES	3
2.2 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE <i>AEROMONAS</i>	6
2.3 OCORRÊNCIA AMBIENTAL E ALIMENTÍCIA DE <i>AEROMONAS</i>	7
2.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE <i>AEROMONAS</i> E SUAS IMPLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	9
2.5 ESTRESSE SALINO E RESPOSTA BACTERIANA.	10
2.6 SISTEMAS DE TRANSPORTES E RESPOSTA A ESTRESSE SALINO	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	19
3.2 CRESCIMENTO DE <i>AEROMONAS</i> SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO	19
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO OSMOPROTETOR E OSMOLÍTICO DE BETAÍNA E COLINA SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>AEROMONAS</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO	20

3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ADAPTATIVO NA VIABILIDADE CELULAR, PERDA DE PROTEÍNAS E MATERIAL GENÉTICO EM <i>AEROMONAS</i> MANTIDAS SOB ESTRESSE SALINO...	21
3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>proV</i> EM <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i>	22
3.5.1 <i>Extração de RNA total</i>	22
3.5.2 <i>Desenho dos primers para amplificação gene-específico (<i>proV</i>) e gene-referência (16S rRNA) através de Real Time PCR (qRT-PCR)</i>	23
3.5.3 <i>Transcrição reversa para obtenção de cDNA</i>	23
3.5.4 <i>Amplificação por Real time PCR (qRT-PCR)</i>	24
3.5.5 <i>Análise dos resultados do qRT-PCR</i>	24
3.6 ANÁLISES COMPUTACIONAIS – BIOINFORMÁTICA	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 EFEITO DA TOLERÂNCIA A CLORETO DE SÓDIO SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>AEROMONAS</i>	25
4.2 EFEITO OSMOPROTETOR DA BETAÍNA E DA COLINA EM <i>AEROMONAS</i>	27
4.3 EFEITO DO ESTRESSE OSMÓTICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR, PERDA PROTEICA E DE MATERIAL GENÉTICO EM <i>AEROMONAS</i>	33
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CONSERVAÇÃO DO OPERON PROU EM BACTÉRIAS.....	28
TABELA 2. ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS DO OPERON PROU DE <i>AEROMONAS</i> <i>HYDROPHILA</i> E OUTRAS BACTÉRIAS.	30
TABELA 3. EFEITO DA BETAÍNA SOBRE O TEMPO DE FASE DE ADAPTAÇÃO (LAG) DE <i>AEROMONAS</i> CRESCIDAS EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.	31
TABELA 4. EFEITO DA BETAÍNA SOBRE ABSORBÂNCIA MÁXIMA (600NM) DE <i>AEROMONAS</i> CRESCIDAS EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.	32

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. LINHAGENS DE <i>AEROMONAS</i> UTILIZADAS NO TRABALHO.....	19
QUADRO 2. SEQUÊNCIA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>PROV</i>	23

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> ADERIDA A CÉLULAS EPITELIAIS HUMANAS. (FONTE: HTTP://WWW.NWFSC.NOAA.GOV/ 2002).....	4
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM TÍPICO TRANSPORTADOR DO TIPO ABC EM MEMBRANA CELULAR. (ADAPTADA DE BURKE & ARDEHAL, 2007).	17
FIGURA 3. CRESCIMENTO DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> ATCC 7966 (A) E <i>AEROMONAS TROTA</i> ATCC 79657 (B) EM MEIO M9 COM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl.....	26
FIGURA 4. CRESCIMENTO DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> (ATCC 7966) E <i>AEROMONAS TROTA</i> (ATCC 79657) EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO COM E SEM COLINA E BETAÍNA.....	27
FIGURA 5. ESQUEMA DO OPERON <i>PROU</i> EM <i>AEROMONAS</i>	29
FIGURA 6. EXPRESSÃO DO GENE <i>PROV</i> DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> CRESCIDAS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OSMÓTICO POR 48H.....	33
FIGURA 7. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> ATCC 7966 (A) E <i>AEROMONAS TROTA</i> ATCC 49657 (B) EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.	34
FIGURA 8. DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MATERIAL GENÉTICO EM <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> ATCC 7966 (A) E <i>AEROMONAS TROTA</i> ATCC 49657 (B) EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.	35
FIGURA 9. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> ATCC 7966 (A E B) E <i>AEROMONAS TROTA</i> ATCC 49657 (C E D) EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO, (A) E (C) SEM PRÉ TRATAMENTO, (B) E (D) COM PRÉ TRATAMENTO. .	36
FIGURA 10. EXPRESSÃO DO GENE <i>PROV</i> DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> EM SISTEMA ADAPTATIVO DE ESTRESSE SALINO.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR – Polymerase Chain Reaction
SSCP – Single-strand Conformation Polymorphism
BHI – Caldo Cérebro Coração
ABC – *ATP-Binding Cassette*
UFC – Unidades formadoras de colônias
Pb – Pares de bases
TMD – Domínio Transmembrana
DIM – Domínio Integral de Membrana
NBD – Nucleotide-binding domain
SBP – Substrate Binding Protein
NCBI – National Collection of Industrial Bacteria
CECT – Collécion Española de Cultivos
CCT – Coleção de Culturas Tropical
LB – Luria Bertani
M9 – Meio Mínimo
PBS – Phosphate Buffered Saline
DEPC – Dietilpirocarbonato – inibidor de RNase
Abs – Absorbância
qRT – Real-time reverse-transcription
NMR – Ressonância Magnética Nuclear
Nested – Nested Polymerase Chain Reaction
RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA
REP – Repetitive element palindromic
ERIC – Enterobacterial repetitive intergenic consensus
ATP – Adenosina Trifosfato

RESUMO

As bactérias do gênero *Aeromonas* são importantes microrganismos aquáticos e agentes causais de doenças infecciosas em animais, inclusive o homem. Sua ampla distribuição em ambientes aquáticos continentais e marinhos é indicativa da sua capacidade de adaptação a distintos níveis de salinidade, fato por sua vez relevante na contaminação de alimentos. A tolerância bacteriana ao estresse salino está associada à manutenção da homeostase celular através de sistemas de transporte de íons e acúmulo de solutos orgânicos, como betaína, prolina, entre outros. A betaína é um osmoprotetor encontrado em plantas, animais e microrganismos sendo transportado em bactérias através de um sistema de transporte do tipo ABC específico codificado pelo operon ProU. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a tolerância ao estresse salino em *Aeromonas*, incluindo determinar o crescimento e a viabilidade celular em *Aeromonas* em estresse salino, avaliar a expressão dos genes de transporte de betaína após estresse salino e realizar uma análise *in silico* do operon proU em bactérias Gram negativas. Os resultados mostram que *Aeromonas trola* apresenta mais tolerância à salinidade do que *Aeromonas hydrophila*, sendo que algumas espécies de *Aeromonas* podem crescer em meio mínimo contendo até 0,42M de NaCl, concentração utilizada como agente de preservação de alimentos. A betaína atua como osmoprotetor em *Aeromonas*, determinando a sua capacidade de sobrevivência e crescimento em concentrações mais elevadas de cloreto de sódio (0,51 a 0,68M). Por outro lado, a colina, considerada importante precursor da betaína em algumas bactérias, não apresenta efeito osmoprotetor em *Aeromonas*. Avaliação de pré-crescimento com betaína mostram que este osmoprotetor é acumulado mesmo na ausência de estresse, determinando uma pré-adaptação bacteriana a mudanças de osmolaridade. Análise *in silico* do operon proU, responsável pelo transporte de betaína, mostra elevada conservação do mesmo em bactérias, indicando a importância deste transportador ABC. Experimentos de expressão do operon proU em *A. hydrophila* mostraram expressão constitutiva basal e aumento significativo da expressão do operon proU em bactérias submetidas a estresse osmótico, mesmo na ausência do osmoprotetor. Assim sendo, a expressão do operon proU em *A. hydrophila* é modulada pelo estresse intracelular, de tal forma que a mesma volta a níveis próximos do basal quando a célula atinge a homeostase.

Palavras-chave: *Aeromonas*, halotolerância, osmoprotetores, betaína.

ABSTRACT

The bacteria from the *Aeromonas* genus are important aquatic microorganisms and causative agents of infectious diseases in animals, and even to mankind. Its wide distribution in continental aquatic and marine environments is an indicative of its ability to adapt to different levels of salinity, which is a relevant fact concerning food contamination. The bacterial tolerance to saline stress is associated with the maintenance of cellular homeostasis through ion transportation systems and the accumulation of organic solutes, such as betaine, proline, among others. Betaine is an osmoprotectant found in plants, animals and microorganisms, transported in bacteria by a transportation system of the ABC specific type, encoded by operon ProU. In this context, the objectives of this study were: to measure the tolerance to saline stress in *Aeromonas*, including determining the growth and cell viability in *Aeromonas* in saline stress, evaluate the expression of betaine transport genes after saline stress and create an *in silico* analysis of the proU operon in Gram negative bacteria. The results demonstrate that *Aeromonas trota* present more salinity tolerance than *Aeromonas hydrophila*, and that some *Aeromonas* species can grow in minimal environment containing up to 0.42 M of NaCl, concentration used as a food preservative agent. The betaine acts as an osmoprotectant in *Aeromonas*, determining their capacity to survive and grow in higher concentrations of sodium chloride (0.51 to 0.68 M). On the other hand, the choline, considered as an important betaine precursor in some bacteria, presents no osmoprotectant effect on *Aeromonas*. The evaluation of pre-growth with betaine show that this osmoprotectant is accumulated even in the absence of stress, determining a bacterial pre-adaptation to changes in osmolarity. The *in silico* analysis of the operon proU, responsible for betaine transportation, shows their high conservation in bacteria, indicating the importance of this ABC transporter. Expression experiments of the operon proU in *A. hydrophila* showed constitutive basal expression and significant increase of the operon proU expression in bacteria exposed to osmotic stress, even in the absence of the osmoprotectant. Therefore, the operon proU expression in *A. hydrophila* is modulated by intracellular stress, in such manner, that it returns to close baseline levels when the cell reaches homeostasis.

Keywords: *Aeromonas*, halotolerance, osmoprotectors, betaine.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Aeromonas*, família Aeromonadaceae, são bacilos Gram negativos com ampla distribuição na natureza, sendo encontradas em ecossistemas aquáticos que englobam desde lagos, rios, estuários e reservatórios até locais de tratamento de água potável e de esgotos. Algumas espécies são reconhecidas como patógenos oportunistas tanto de animais de sangue frio (peixes, répteis e anfíbios) como quentes (aves e mamíferos).

Algumas espécies são consideradas halotolerantes e podem crescer em concentrações de cloreto de sódio na ordem de 0,1 a 1,0 M, fato que amplia os nichos ecológicos do gênero, entre os quais ambientes estuarinos. A halotolerância em bactérias parece estar relacionada principalmente com o transporte de osmoprotetores através de sistemas do tipo ABC (*ATP-Binding Cassete*) e a síntese de osmolitos.

A habilidade para se adaptar a flutuações na osmolaridade externa é fundamental para a sobrevivência do organismo e os mecanismos para adaptação osmótica estão recentemente sendo estudados. Assim, o gênero *Aeromonas* tem recebido uma atenção especial em virtude de sua ampla capacidade de estabelecimento em uma variada escala de condições ambientais e, principalmente, pelo fato de estes organismos estarem associados a doenças tanto em animais de sangue frio quanto em animais de sangue quente, incluindo o homem. Cabe ressaltar que nos últimos anos, surtos de doenças de origem alimentar têm sido atribuídos a algumas espécies deste gênero, sendo assim considerados patógenos emergentes.

Os sistemas de transportes são importantes para sobrevivência da bactéria, pois medeiam à entrada de solutos para célula, que vão desde nutrientes para o crescimento a moléculas que garantem a homeostase celular. Entre os sistemas de transporte dependentes de energia destacam-se os transportadores do tipo ABC, os quais em geral envolvem proteínas periplasmáticas, proteínas transmembrana e ATPases.

O estudo em específico deste sistema de transporte pode contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia e do mecanismo de patogenicidade deste microrganismo. Além disso, o estudo aprofundado deste mecanismo de transporte, em particular o gene *proV*, poderá contribuir para o desenvolvimento de novas medidas de controle baseadas na inativação deste sistema específico de transporte.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a tolerância de *Aeromonas* spp. ao estresse salino, relacionando-se os seguintes objetivos específicos: avaliar (1) o crescimento e a viabilidade celular destas bactérias sob diferentes concentrações de

cloreto de sódio; (2) analisar o efeito de osmoprotetores sobre a tolerância à salinidade; (3) determinar a expressão dos genes de transporte de betaína em distintas condições de estresse salino; e (4) comparar, por análise bioinformática, o operon proU e as proteínas por ele codificadas em *Aeromonas* e outras bactérias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do gênero *Aeromonas* e suas espécies

O termo *Aeromonas* deriva das palavras gregas “aer” que significa ar ou gás e “monas” que significa unidade, portanto, unidades produtoras de gás (Isonhood e Drake 2002).

Os membros do gênero *Aeromonas* são bacilos Gram negativos (Figura 1), que apresentam morfologia celular distinta, tendo considerável variação na forma e tamanho das células (Varnan e Evans, 1991; ICMSF, 1996). Em algumas circunstâncias, podem ter forma de cocobacilos ou filamentosas (Martin-Carnahan e Joseph, 2005). Por definição, são anaeróbios facultativos, oxidase e catalase positiva, capazes de oxidar e fermentar glicose e redutores de nitrato a nitrito (Varnam e Evans 1996; Abbott, 2003; Tequianes-Bravo *et al.*, 2005). Além destas características classificatórias, Varnam e Evans (1996), Isonhood e Drake (2002) e Holt (1994) citaram a capacidade de fermentar frutose, maltose e trealose, com produção de ácido e gás.

Devido à heterogeneidade fenotípica apresentada entre as espécies deste gênero, consideráveis esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de métodos que permitam identificar e reclassificar corretamente as espécies de *Aeromonas* (Uehara, 2008). A taxonomia do gênero *Aeromonas* é controversa, complexa e constantemente sofre mudanças, isso devido às novas espécies que vêm sendo descritas e reclassificadas ou de estudos mais aprofundados em espécies já conhecidas. Durante alguns anos, este gênero foi classificado dentro da família Vibrionaceae (Carnahan e Altwegg, 1996; Altwegg, 1999), mas atualmente encontra-se classificado em uma família denominada Aeromonadaceae, que inclui os gêneros *Aeromonas* e *Pleisomonas* (Colwell e MacDonell, 1986; Martinez-Murcia *et al.*, 1992; Garrit *et al.*, 2001).

Durante as últimas décadas, o gênero *Aeromonas* foi submetido a uma série de mudanças classificatórias de importância prática. Em paralelo com o progresso molecular, várias novas espécies foram identificadas com base filogenética e os genomas de *A. hydrophila* (Seshadri *et al.*, 2006), *A. salmonicida* (Reith *et al.*; 2008) e *A. veronii* (Li *et al.*; 2011) foram sequenciados.

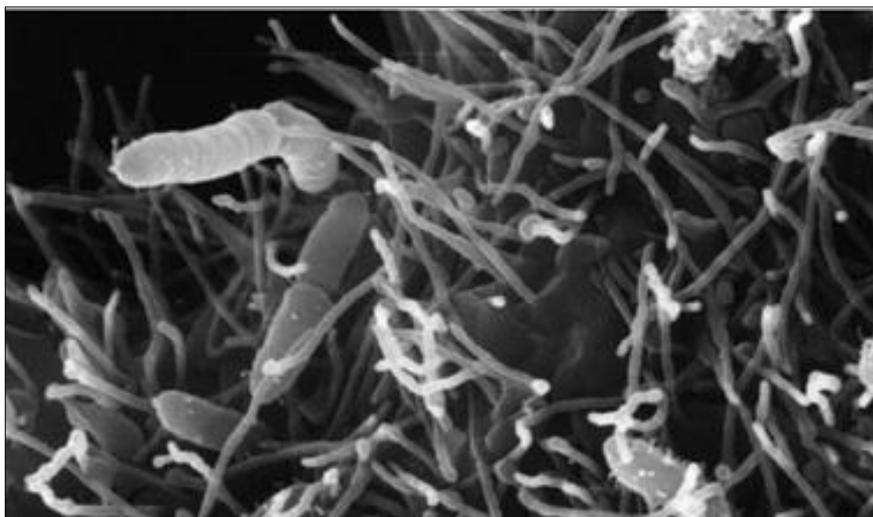


Figura 1. Microscopia eletrônica de *Aeromonas hydrophila* aderida a células epiteliais humanas. (Fonte: <http://www.nwfsc.noaa.gov/> 2002).

Segundo Palumbo *et al.* (2001), essas bactérias possuem a capacidade de produzir exoenzimas (amilase, protease, fosfolipase e nucleases), além de resistir ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina fosfato).

Este gênero segundo descrição de Palumbo *et al.* (2001) e Garcia-López *et al.* (2004) possui dois grupos: um composto pelas espécies móveis e mesofílicas (como *A. hydrophila*) e outro pelas espécies imóveis e psicrotólicas (como *A. salmonicida*). A mobilidade dessas bactérias geralmente se deve à presença de flagelos polares com algumas evidências de flagelos laterais, embora flagelos peritríquios possam ser formados em culturas jovens desenvolvidas em meios sólidos (Garrit *et al.*, 2001; Koneman *et al.*, 2001).

Muitas são as dificuldades encontradas na identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie, mas uma das principais se deve ao elevado número de grupos taxonômicos onde apenas características bioquímicas selecionadas sobre as novas espécies descritas geralmente são apresentadas. Mesmo que os testes utilizados sejam os mesmos em cada estudo, as condições de crescimento, composição do meio de cultura, procedimento de inoculação e condições de incubação podem variar, afetando assim os resultados (Abbott *et al.*, 2003).

Segundo Abbott *et al.* (2003) e Vizzotto (2009), muitos dos esquemas bioquímicos usados nos laboratórios clínicos para a identificação de *Aeromonas* são anteriores à descrição de novos grupos taxonômicos, sendo que a diversidade nas metodologias tem dificultado o desenvolvimento de esquemas de tipagem e propriedades fenotípicas consistentes para identificar a maioria das estirpes de *Aeromonas* em nível de espécie em laboratórios clínicos.

Cepas de *Aeromonas* foram analisadas por testes bioquímicos em que, dos 63 testes fenotípicos, somente quatro apresentaram resultados homogêneos (fermentação de D-glucose, produção de nitrato redutase, e não produção de ácido a partir de dulcitol e eritritol). Devido a estes fatos, pode ser observada uma dificuldade na identificação de isolados de *Aeromonas* ao nível de espécie sem a utilização de um grande número de testes bioquímicos (Abbott *et al.*, 2003; Vizzotto, 2009).

A grande dificuldade de classificação de *Aeromonas* com base em testes bioquímicos e a sua importância clínica, ambiental e industrial tem propiciado o desenvolvimento de sistemas moleculares de identificação. Entre estes sistemas, cabe ressaltar a utilização da análise de fragmentos de restrição de segmentos amplificados (RFLP-PCR) do gene codificador do RNA ribossomal 16S (16S rDNA), que tem permitido a identificação da maior parte das espécies de *Aeromonas*, particularmente com avaliação de perfis de restrição de enzimas como AluI, MboI, MnlI e CfoI (Graf, 1999; Borrell *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000). Por outro lado, moderada conservação interespecífica e alta variabilidade intraespecífica faz com que a análise de RFLP-PCR 16S rDNA seja até hoje uma ferramenta de eficiência discutível (Figueras *et al.*, 2007; Ormen *et al.*, 2005).

Como alternativa, Trakhna *et al.* (2009) desenvolveram um ensaio de PCR para a detecção de *A. hydrophila* em amostras ambientais e clínicas, utilizando “primers” e sondas que têm como alvo as sequências do gene 16S rRNA e o gene da enterotoxina citolítica (aerA) revelando uma alta discriminação entre *A. hydrophila* e outras espécies do gênero. Delamare *et al.* (2012), por sua vez, mostraram que o gene de lipase extracelular (lip) pode ser utilizado para a detecção de isolados de *Aeromonas* spp. em amostras ambientais e clínicas, podendo levar à classificação quando associado a análise de SSCP (single-strand conformation polymorphism) do segmento amplificado. Além dos exemplos anteriores, Nested-PCR do gene da aerolisina foi utilizado com sucesso em medicina legal no estudo de casos de óbito por afogamento (Aoyagy *et al.*, 2009).

Visando estudos epidemiológicos, Szczuka e Kaznowski (2004) compararam as técnicas de RAPD, REP-PCR e ERIC-PCR na análise de clones de *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media* e *A. veronii* isoladas de amostras ambientais e clínica e constataram que os métodos de RAPD e ERIC-PCR possuem o mesmo poder discriminatório, provando, assim, serem úteis para as investigações epidemiológicas e análise genética populacional de *Aeromonas*.

2.2 Importância Clínica de *Aeromonas*

Espécies de *Aeromonas* são patógenos humanos emergentes, que produzem uma série de fatores de virulência e causam doenças que variam desde gastroenterite a infecções sistêmicas. Podem ser encontradas em alimentos e água e produzem toxinas em temperaturas de refrigeração, o que aumenta o risco de intoxicação alimentar (Galindo, 2006).

Diversos pesquisadores vêm desenvolvendo estudos sobre a ocorrência, isolamento, patogenicidade e sensibilidade aos antimicrobianos, assim como doenças transmitidas a humanos e animais por bactérias do gênero *Aeromonas* (Rodrigues, 2007).

Algumas espécies do gênero *Aeromonas* são reconhecidas como patógenos oportunistas de peixes (*A. salmonicida*) e outros animais de sangue frio (anfíbios e répteis). Outras espécies, como *A. hydrophila*, compreendem importantes patógenos oportunistas de humanos, causando septicemia primária e secundária, infecções em ferimentos e outras doenças pouco descritas como infecções do trato respiratório e urinário, meningite, infecções oculares, periondontites, gastroenterites e diarreia crônica (Janda *et al.*, 1996).

Estudos mostram uma relação direta entre a ingestão de alimentos contaminados com espécies de *Aeromonas* e o desenvolvimento de gastroenterites (Janda *et al.*, 1995; Saad *et al.*, 1995; Altwegg, 1999; Santos *et al.*, 1999; Lucena, 2007). Além de alimentos, a ingestão de água contaminada (Koneman *et al.*, 2001; Abbott *et al.*, 2003; Lucena, 2007) têm sido implicadas na transmissão de *Aeromonas*.

As espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* são as mais associadas com infecções em humanos e somam mais de 85% dos isolados clínicos deste gênero (Janda e Abbott, 1998; Vila *et al.*, 2003; Al-Benwan *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2009). As bactérias do gênero *Aeromonas* representam um importante grupo de bactérias enteropatogênicas presentes em 57,4% das diarreias bacterianas avaliadas em pacientes do Hospital Geral de Caxias do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Guerra, 2001).

Além de gastroenterites, podem ser citadas infecções em ferimentos como a segunda maior fonte de isolados clínicos deste gênero. Do mesmo modo que a gastroenterite, os sintomas clínicos associados com infecções em ferimentos causadas por *Aeromonas* variam de pessoa para pessoa, dependendo fundamentalmente da resposta imune do hospedeiro, e abrangem desde infecções superficiais moderadas como celulite a infecções profundas mais sérias como ectima gangrenosa e mionecrose, que envolvem fáscia, tendões, músculos, ossos e articulações (Galindo *et al.*, 2006; Vizzotto, 2009).

2.3 Ocorrência ambiental e alimentícia de *Aeromonas*

Aeromonas são organismos autóctones de ambientes aquáticos, sendo encontradas em uma grande variedade de condições, incluindo águas oligotróficas e eutróficas, de efluentes (esgotos), destinadas ao consumo (mesmo após tratamento com cloro), estuarinas e marinhas, podendo também ser encontradas no solo (Burk *et al.*, 1984; Gavriel *et al.*, 1998). São poucos os dados na literatura referentes à presença de *Aeromonas* no solo; no entanto, estudos mostram que elas podem persistir e multiplicar-se, sugerindo que o solo é um importante reservatório para esses microrganismos (Brandi *et al.*, 1996).

Segundo Schubert (1991), Kirov (1993), Chopra e Houston (1999) e Hernould (2008), a incidência de *Aeromonas* nos sistemas de distribuição de águas tratadas tem sido alvo de interesse. A concentração destes microrganismos varia com as estações do ano e quando a temperatura ambiente é superior a 20°C verifica-se um aumento correspondendo à época de maior incidência de quadros diarréicos, o que apoia a hipótese de que a água e os alimentos são os principais veículos de transmissão deste gênero (Ribeiro, 2008).

Gavriel *et al.* (1998) avaliaram 31 sistemas de distribuição de água e comprovaram a capacidade de sobrevivência de *Aeromonas* em reservatórios de água com níveis de cloro de 0,45 mg/L. Já para Vieira (2003), a cloração de águas e o uso de outros desinfetantes têm sido eficazes no controle da contaminação por espécies do gênero *Aeromonas*, assim como de outras bactérias Gram negativas.

Estudos mostram que a presença de *Aeromonas* na água e alimentos é um risco para a saúde pública, já que estes microrganismos produzem um conjunto de fatores de virulência, sendo que a patogenicidade das infecções associadas a estes microrganismos é considerada complexa e multifatorial (Chopra *et al.*, 2000). Dentre os principais fatores que contribuem para a virulência de *Aeromonas*, incluem-se toxinas, proteases, hemolisinas, lipases, adesinas, aglutininas e várias enzimas hidrolíticas (Huys *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 2003).

Alimento como pescado, tanto de água doce como marinhos, eram tidos como os únicos susceptíveis a contaminação por *Aeromonas*; porém, devido ao número crescente de pesquisas envolvendo outros tipos de alimentos, constatou-se que essas bactérias podem ser encontradas também em carne *in natura* e processadas, vegetais frescos, mariscos, queijos e leite (Rodrigues, 2007). Segundo Palumbo (1995), Castro-Escarpulli *et al.*, (2003) e Cansian *et al.*, (2005), *Aeromonas* spp. persistem em carnes suínas, de frango e bovinas, mesmo em temperaturas baixas como -2°C (Lucena, 2007).

Assim sendo, o armazenamento dos alimentos à temperatura de refrigeração (4°C) não é um método seguro de inibição do crescimento de bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, devido à sua característica psicrotrófica (Kirov, 1993). Conforme Franco e Landgraf (2005), algumas espécies do gênero *Aeromonas* tem capacidade de sobreviver e multiplicar-se em uma variedade de produtos alimentícios quando armazenados entre -2 e 10°C. Assim, segundo Kirov (2001), o uso de outros métodos de preservação é necessário para impedir a transmissão desta bactéria pelos alimentos, tais como processamento térmico (pasteurização) e controle da contaminação cruzada (Oliveira, 2009).

De acordo com Rodrigues (2007), o estudo da ocorrência de *Aeromonas* em produtos de origem vegetal (legumes e hortaliças) não tem sido enfatizado, mas por serem produtos consumidos *in natura*, o perigo de contaminação de consumidores é maior. No Brasil, Saad *et al.* (1995) constataram a presença de *Aeromonas* em 43% das amostras de vegetais comercializados na CEASA de São Paulo, com contagens que variaram entre 10^2 a 2×10^6 UFC/g.

No caso de leite, por exemplo, a contaminação com *Aeromonas* é veiculada pela água (Amaral *et al.*, 2006). Estes autores sugerem que a água utilizada nas propriedades leiteiras pode constituir um fator de risco para a saúde dos seres humanos. Considerando que as bactérias do gênero *Aeromonas* possuem a capacidade de sobreviver e multiplicar em alimentos mantidos sob refrigeração e que muitas de suas cepas são capazes de produzir toxinas, a sua presença em alimentos lácteos pode representar um sério risco à saúde, principalmente, para o segmento da população considerada de alto risco, como crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos (Carneiro e Rossi Júnior, 2006).

Bulhões *et al.*, (2002) analisaram amostras de queijo minas frescal tipo artesanal adquiridas no comércio varejista dos municípios de Poços de Caldas -MG e Jaboticabal-SP e verificaram que 51,2% das amostras encontravam-se contaminadas por *Aeromonas* com populações que variavam de $5,0 \times 10^3$ a $4,0 \times 10^5$ UFC/g.

Alguns estudos consideram as espécies *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* predominantes dentre as espécies isoladas de leite e subprodutos (KIROV *et al.*, 1993).

FREITAS (1993) relatou o isolamento de *Aeromonas* spp. em 32,0% das amostras de queijo branco coletadas em supermercados do Rio de Janeiro, sendo 28,0% das culturas produtoras de enterotoxinas.

Segundo Chopra e Houston (1999); Galindo *et al.* (2006) e Vizzotto (2009), *Aeromonas* são frequentemente isoladas de amostras clínicas, ambientais e alimentícias, em

que podem se desenvolver a baixas temperaturas e produzir toxinas, o que aumenta o risco de intoxicação alimentar.

2.4 Características físicas, químicas e biológicas de *Aeromonas* e suas implicações na indústria de alimentos

Dentre as características do gênero, *Aeromonas* cresce em uma ampla escala de condições ambientais como valores de pH entre 4,0 a 10,0 (Delamare *et al.*, 1999; Cattani, 2008). Porém, segundo Palumbo e colaboradores (1985), bactérias deste gênero são sensíveis a pH abaixo de 6,0. De acordo com Isonhood e Drake (2002), *A. hydrophila* suporta pH entre 5,5 a 9,0, sendo que o melhor desenvolvimento acontece em pH neutro ou levemente alcalino.

Merino *et al.* (1995) e Palumbo *et al.* (2001) declararam que *A. hydrophila* é sensível quando submetida a pH abaixo de 6,0 podendo crescer até em pH de 5,8. Todavia, em maionese e pescado, que são alimentos ácidos, o crescimento deste microrganismo ocorre quando em condições ótimas de temperatura (28°C) e na presença de 0,085M de NaCl (Rodrigues, 2007).

Com relação à temperatura de crescimento, estas bactérias crescem entre 4 a 42°C, sendo 28°C a temperatura ótima (Varnam e Evans, 1996; Blair *et al.*, 1999; Euzéby, 2003; Garcia-López *et al.*, 2004 e Zucolotto *et al.*, 2006), sendo inativadas em temperaturas superiores a 45°C (Varnam e Evans, 1996). Segundo Popoff (1984), a maioria das espécies de *Aeromonas* desenvolve-se numa faixa de temperatura entre 5 a 41°C, com exceção de *A. salmonicida* que não cresce a 37°C, sendo a faixa de temperatura ótima de crescimento desse gênero de 22 a 28°C. Conforme relatado por Varnam e Evans (1996), *A. hydrophila* pode crescer em alimentos com temperaturas que variam de -0,1 a 1,2°C, sendo evidente seu crescimento em temperatura igual ou superior a 4°C. Contrariando até certo ponto os autores citados anteriormente, Garcia-López *et al.* (2004) declararam que a faixa de crescimento de *Aeromonas* é de -5 a 45°C.

O calor e a irradiação são métodos bastante efetivos na destruição de espécies do gênero *Aeromonas*, sendo estas mais sensíveis ao calor do que *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium* (Nishikama *et al.*, 1993).

Em relação à atmosfera de crescimento, ocorre um bom desenvolvimento em anaerobiose e aerobiose, sendo assim, considerados microrganismos anaeróbios facultativos.

Espécies do Gênero *Aeromonas* crescem pouco em atmosferas modificadas, dependendo da microbiota natural e do número de microrganismos competidores (Kirov, 2001).

De acordo com Buchanam e Palumbo (1985) embalagens em atmosfera modificada com baixos teores de O₂ podem proporcionar o desenvolvimento de *Aeromonas* devido à inibição do crescimento de *Pseudomonas spp.*

Ingham, (1990) relatou que em um experimento realizado com lagostas embaladas em atmosferas modificadas contendo 80% de CO₂ e 20% de N₂ observou pouco desenvolvimento em temperatura de 8°C o que não ocorreu quando armazenado a 2°C que teve um ligeiro crescimento, e isolando *A. hydrophila* em alimentos embalados a vácuo, concluiu que o O₂ exerce pouca influência no crescimento dessa espécie.

Já, considerando os parâmetros de atividade de água (aw), Merino *et al.*, (1995), observaram que em condições de laboratório, o microrganismo foi capaz de se multiplicar com taxa de aw superior a 0,94. Com temperatura de 3,8⁰C a multiplicação só foi observada com taxa de aw superior a 0,98 e associada à baixa concentração de sal. Para as amostras de queijo em estudo a aw média foi de 0,98, indicando a possibilidade da multiplicação das *Aeromonas* neste alimento, desde que os demais fatores fossem favoráveis.

2.5 Estresse salino e resposta bacteriana.

Nos ambientes naturais, os microrganismos estão normalmente expostos a mudanças drásticas de temperatura, acidez e osmolaridade/salinidade. Estas alterações ambientais causam desequilíbrio na homeostase celular, impondo condições de estresse devido à alteração de atividades enzimáticas específicas, disponibilidade de nutrientes, modificações na membrana celular e alterações conformacionais de macromoléculas, que dependendo da intensidade podem levar à morte do microrganismo (Csonka, 1989; Hill 2001). Assim sendo, a capacidade dos organismos em responder às flutuações da osmolaridade em seus ambientes é um processo fisiológico importante que determina a sua capacidade de prosperar em uma variedade de habitats (Csonka, 1989).

A salinidade elevada apresenta dois possíveis efeitos sobre as células: efeito osmótico inespecífico e toxicidade específica dos íons sobre sistemas celulares determinados. Para enfrentar estes efeitos, os organismos desenvolveram defesas baseadas no ajuste da osmolaridade, modificação dos sistemas de transporte de íons e produção de proteínas de defesa a estresse (Csonka, 1989; Serrano, 1994).

As bactérias geralmente mantêm a pressão osmótica intracelular maior do que a do meio de crescimento de forma a gerar o turgor celular necessário para diversos processos como crescimento e divisão celular. O aumento da osmolaridade do meio pode desidratar o citoplasma causando a plasmólise da célula; já em meio hipotônico, a entrada excessiva de água pode causar a lise celular. A capacidade de adaptação a mudanças na osmolaridade do meio é, portanto, muito importante para a sobrevivência da célula (Sleator e Hill, 2002). Segundo os mesmos autores, em resposta a um aumento da osmolaridade do meio, duas estratégias tem sido descritas para a adaptação de células procarióticas: a manutenção de uma alta concentração de sal no citoplasma e o acúmulo de osmoprotetores. A primeira é utilizada por organismos de crescimento restrito a ambientes com alta osmolaridade, que toleram altas concentrações de sal no meio (halobactérias). Já o acúmulo de osmoprotetores é bastante utilizado e tem sido descrito em diversas bactérias como *E. coli*, *B. subtilis* e *Salmonella* (Koide, 2006).

Estudos realizados em *E. coli* e *S. enterica typhimurium* mostram que o maior componente da toxicidade à salinidade é o efeito osmótico produzido por altas concentrações de cloreto de sódio. Isso é demonstrado pelo fato de: concentrações isosmóticas de sacarose e cloreto de sódio apresentam efeitos inibitórios semelhantes (Csonka, 1981), a tolerância à salinidade aumenta quando a adaptação osmótica é induzida pela incorporação de prolina ou pelo aumento da produção deste aminoácido em mutantes (Csonka e Hansos, 1991) e linhagens mutantes com aumento da excreção de sódio não mostram um aumento significativo de tolerância à salinidade (Carmel *et al.*, 1994). Em *E. coli*, um sistema ativo de bomba Na^+/H^+ , em condições de estresse salino moderado, mantém as concentrações intracelulares de sódio em níveis suficientemente baixos para evitar os efeitos tóxicos (Schuldiner e Padan, 1992).

O estresse osmótico deve ser percebido e convertido em modificações específicas de atividades enzimáticas de tal forma que o desequilíbrio osmótico possa ser rapidamente superado, causando o mínimo de interferência no metabolismo celular. Os estudos realizados até o momento mostram que as bactérias Gram positivas e negativas utilizam estratégias distintas para responder ao estresse osmótico. Entretanto, independentemente da bactéria, a resposta ao estresse osmótico envolve uma resposta imediata que visa proteger as estruturas celulares e manter a atividade enzimática básica e uma resposta adaptativa que visa garantir o metabolismo celular e o crescimento celular na condição estressante (Csonka, 1989; Hill 2001).

O crescimento celular é geralmente inibido pela salinidade ambiental extrema. No entanto, os organismos halofílicos têm a capacidade de tolerar vasta gama de estresse salino (Measures, 1975; Milner *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1988).

Solutos compatíveis são compostos altamente solúveis e não são tóxicos em concentrações elevadas, sendo responsáveis por auxiliar na manutenção do turgor celular, aumentando as forças coesivas na estrutura da água e favorecendo a estabilização das estruturas proteicas. Existem diversos tipos de solutos compatíveis: aminoácidos (glutamato, prolina), derivados de aminoácidos (ectoina, betaína), peptídeos, metilaminas (carnitina), polióis (glicerol, glicosilglicerol) e açúcares (trealose, sacarose), (Bremer e Kramer, 2000; Yancey, 1994, Koide, 2006). Vários solutos compatíveis tem se mostrado efetivos para aumentar a pressão osmótica no citoplasma e também na estabilização de proteínas e membranas quando os níveis de sal ou temperaturas são desfavoráveis, sendo, portanto, importantes na adaptação das células a várias condições ambientais adversas (Yancey, 1994).

As bactérias enfrentam o estresse hiperosmótico acumulando solutos compatíveis pela captação e/ou síntese dos mesmos (Van der Heide e Poolman, 2000). A absorção de solutos compatíveis pelas bactérias a partir do ambiente é o mecanismo preferido para osmoadaptação e a maioria das bactérias é capaz de importar pelo menos um dos solutos osmocompatíveis (Kapfhammer *et al.*, 2005).

Consideram-se osmoprotetores os solutos que diminuem o efeito inibitório do estresse osmótico quando adicionados ao meio, enquanto os solutos sintetizados pelo microrganismo em resposta ao estresse osmótico são chamados de osmolitos. Entretanto, o termo osmoprotetor é muitas vezes utilizado para denominar qualquer soluto que possa ajudar a célula a enfrentar o efeito inibitório causado pela elevação da pressão osmótica extracelular. Na maior parte das bactérias Gram negativas, a betaína é o soluto protetor preferencial e geralmente propicia os maiores níveis de osmotolerância, o que reflete sua interação favorável com as distintas macromoléculas (Kempf e Bemer, 1998).

Delamare *et al.* (2003) avaliaram o efeito de aminoácidos e seus derivados (prolina, glicina, ácido glutâmico e betaína), poliálcool (glicerol) e um substrato complexo (extrato de levedura) sobre o crescimento de *A. trota* e *A. hydrophila* em estresse salino. Os resultados mostraram que betaína e extrato de levedura conferem a capacidade de crescer sob alta concentração de sal. O efeito da betaína como osmoprotetor tem sido relatado em várias espécies de bactérias. Em *E.coli*, o acúmulo intracelular de betaína depende de sua síntese a

partir de colina ou a sua captação a partir do meio mediada pelo sistema ProU que é um sistema de transporte de alta afinidade membro da superfamília de transportadores ABC.

Segundo Craig (2004), a betaína é encontrada naturalmente em animais, plantas e microrganismos, descoberta no século XIX a partir do extrato de um suco de beterraba (*Beta vulgaris*). Como osmolito, ela protege as células de estresse ambiental como alta salinidade, hídrico ou temperaturas extremas. Sendo assim, nestes casos, os níveis de betaína e de outros osmoprotetores aumentarão na medida em que a exposição a essas condições aumenta (Bohnert *et al.*, 1995; Boch, 1997; Craig, 2004).

De acordo com Yancey (1982), a função da betaína como osmolito vai além da retenção de água e substituição de sais inorgânicos nas células, pois atua também na preservação de enzimas sensíveis à inativação pelas condições adversas. Sendo assim, a betaína acumulada é capaz de proteger as células do estresse osmótico, permitindo a continuidade das atividades metabólicas normais em condições que inativariam a célula (Teixeira, 2007).

Após uma mudança na osmolaridade do meio, os sistemas de transporte de membrana podem ser ativados ou desativados por um ou mais dos seguintes parâmetros físico-químicos: osmolaridade externa, pressão de turgor (diferenças entre o potencial extra e intracelular de todos os solutos osmoticamente ativos, os quais afetam a compreensão da membrana contra a parede celular), deformação da membrana, pressão hidrostática interna, osmolaridade interna, volume citoplasmático e concentração de moléculas sinais específicas no citoplasma. Os três primeiros parâmetros afetam a célula mais rapidamente do que os restantes, já que após um choque osmótico o aumento da osmolaridade extracelular é instantâneo e a redução na pressão de turgor é rápida, enquanto que o volume intracelular só diminui quando o turgor cai a valores próximos a zero (Csonka e Hanson, 1991).

Como resposta primária ao aumento de osmolaridade do meio, há um rápido aumento da concentração intracelular de potássio; já a resposta secundária consiste no aumento da concentração citoplasmática dos osmoprotetores (Heermann e Jung, 2004).

As variações de volume são dependentes da rigidez da parede celular, o que torna até certo ponto distinta a resposta de bactérias Gram negativas e positivas. De acordo com Boch *et al.* (1996), ao expor *Bacillus subtilis* a um meio hipersalino, inicia-se uma resposta fisiológica para restabelecer o balanço hídrico, manter a turgescência e proteger os componentes da célula contra os efeitos da alta concentração de sal. A defesa mais efetiva contra esse estresse é o acúmulo de grandes quantidades de osmoprotetores, sendo o mais

importante deles a betaína, que é sintetizada por plantas e disponibilizada para *B. subtilis* pela degradação dos tecidos e/ou excreção das raízes das plantas. Além disso, nesta espécie bacteriana foram identificados dois genes cujos produtos servem para converter colina em betaína (Boch *et al.*, 1996).

As bactérias *Actinopolyspora halophila* e *Ectothiorhodospira halochloris* são capazes de viver em ambientes com alto estresse osmótico por serem eficientes produtoras de betaína. A concentração interna de betaína em *A. halophila* pode representar até 33% de seu peso seco e *E. halochloris* pode mostrar um acúmulo de até 2,5M de concentração de betaína intracelular (Nyssola *et al.*, 2000).

Os habitantes dos ecossistemas estuários devem se adaptar continuamente às flutuações temporais e espaciais da concentração de sal. As bactérias que vivem nesses ecossistemas têm desenvolvido uma série de estratégias para lidar com o estresse osmótico (Kapfhammer *et al.*, 2005). Por exemplo, estudos realizados em *Vibrio cholerae*, um patógeno facultativo halofílico encontrado em ambientes marinhos e estuários, revelam que o aumento da salinidade em estuários está associado com picos na incidência de cólera. Kapfhammer *et al.* (2005) mostraram que *V. cholerae* cresce melhor em meio contendo 200 mM de NaCl e KCl, sugerindo que esta bactéria acumula potássio em seu citoplasma. Quando esta espécie é cultivada em meio contendo concentrações de NaCl acima de 200 mM, solutos compatíveis são acumulados no citoplasma. Tem sido demonstrado que muitas bactérias não só sintetizam betaína, mas também apresentam sistemas de transporte deste osmoprotetor, o que sugere que a partilha de solutos compatíveis pode ser um mecanismo de cooperatividade em comunidades microbianas (Kapfhammer *et al.*, 2005).

Vibrio parahaemolyticus é halofílico e exige um mínimo de 0,086M de NaCl para seu crescimento. Este organismo tem a capacidade de crescer em meio acima de 1,5M de NaCl, tornando-o mais osmotolerante que outras espécies do mesmo gênero como *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. fischeri* que ocupam nichos semelhantes (Whitaker *et al.*, 2010).

As tolerâncias às concentrações salinas em *Aeromonas* podem variar de acordo com as linhagens e as condições do meio (Rodrigues, 2007). Palumbo *et al.* (1985) verificaram o crescimento das linhagens BA2 e BA7 de *A. hydrophila* com 0,86M de NaCl em caldo Cérebro e coração, quando incubado na temperatura de 28°C. Estes autores relatam que a maioria das linhagens crescem em concentrações em torno de 0,34 a 0,68 M de NaCl, sendo que algumas precisam da presença de no mínimo 0,51M de NaCl e outras não necessitam deste sal para se desenvolver.

Segundo Knochel (1990), poucas linhagens de *Aeromonas* são tolerantes a 1,02M de NaCl, mas geralmente este gênero não tolera concentrações acima de 0,86M. Vivekanandhan *et al.* (2003) mostraram que concentrações de 0,34M de NaCl reduziu o crescimento de *A. hydrophila*, mas em 0,86M não apresentou nenhum crescimento, embora as células tenham permanecido viáveis. Estes resultados podem explicar a distribuição de *Aeromonas* em águas marinhas e a sua implicação na deterioração de alguns alimentos. Processos usuais de conservação de alimentos (pH < 5, cloreto de sódio > 0,6M) são suficientes para inibir o crescimento de *Aeromonas* (Palumbo *et al.*, 1995).

Delamare *et al.* (1999) examinou a tolerância ao sal em várias espécies de *Aeromonas* crescidas em meio completo. Todas as linhagens foram capazes de crescer a 0,34M de NaCl, sendo que *A. hydrophila*, *A. encheleia*, *A. eichrenophila* e *A. media* toleraram 0,68M de NaCl, já *A. caviae* cresceu em 0,85M e somente *A. trota* em 1,02M.

2.6 Sistemas de transportes e resposta a estresse salino

Até o momento são conhecidos quatro tipos de sistemas de transporte de nutrientes em bactérias: o primeiro sistema utiliza canais protéicos que formam poros na membrana citoplasmática e funciona por difusão facilitada sem gasto de energia, o segundo catalisa o transporte de solutos, o terceiro são transportadores primários e empregam a hidrólise do ATP como fonte de energia para transporte ativo e o quarto consiste nos translocadores que fosforilam seus substratos durante o seu transporte (Paulsen *et al.*, 2000).

Os sistemas de transporte dependentes de energia são classificados como primários e secundários, devido ao tipo de energia utilizada. Os sistemas primários utilizam energia gerada pela clivagem do ATP também chamados de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) e os sistemas secundários utilizam outras fontes de energias celulares como força promotora (Ames *et al.*, 1992; Dassa e Bouige, 2001; Higgins, 2001; Tanabe *et al.*, 2006; Ponte-Sucre, 2007).

Os transportadores ABC são altamente conservados desde as bactérias até o homem. São membros de uma grande família de proteínas, tendo função tanto na captação de nutrientes quanto no transporte de agentes citotóxicos através da membrana celular, resultando na redução dos produtos do catabolismo celular (Saltoratto, 2001).

Este sistema constitui cerca de 5% de genomas bacterianos conhecidos como os de *B. subtilis* e *E. coli* (Young e Holland, 1999; Higgins, 2001). Em *Aeromonas* o perfil dos

sistemas de transporte pode ser comparado aos de *Pseudomonas* spp. e *Vibrio* spp., com uma abundância de transportadores de aminoácidos e peptídeos, e relativamente poucos sistemas de entrada de açúcares. Os sistemas de transporte ABC estão entre uma das famílias de genes mais amplas em *A. hydrophila* (Seshadri *et al.*, 2006).

A estrutura dos transportadores ABC é notavelmente conservada em termos de sequência primária e na organização dos domínios ou subunidades. A característica comum de todos os transportadores ABC é que eles consistem em quatro domínios, dois domínios hidrofóbicos, chamados TMDs (*domínios transmembranas*), também conhecidos como domínios integrais de membrana (DIM), e dois domínios citoplasmáticos denominados NBDs (*domínio de ligação de nucleotídeos ou nucleotide-binding domain*). Os TMDs consistem de alfa-hélices, incorporados na bicamada de membrana, que reconhecem uma variedade de substratos e é responsável pela formação do poro por onde a substância é transportada. A sequência e a arquitetura dos TMDs é variável, refletindo a diversidade química de substratos que podem ser transportadas. O domínio NBD ou ATP-binding cassette (ABC), por outro lado, está localizado no citoplasma, tem uma sequência altamente conservada e é o local para ligação de ATP. Um quinto elemento, constituído pela proteína ligadora de substrato SBP (*Substrate Binding Protein*), é responsável pela especificidade e afinidade do sistema ao substrato específico (Higgins, 2001; Rees *et al.*, 2009).

Em bactérias Gram negativas, a proteína ligadora de substrato SBP se encontra livre no periplasma, enquanto que em bactérias Gram positivas é encontrada na forma de lipoproteínas ancoradas por meio de uma acil-gliceril-cisteína N-terminal, a face externa da membrana citoplasmática. Os genes responsáveis pela codificação dos diferentes componentes que constituem os sistemas ABC de bactérias estão geralmente organizados na forma de um operon (Mourez *et al.*, 1997; Young e Holland, 1999; Dassa, 2000; Higgins, 2001; Rees *et al.*, 2009). Os transportadores do tipo ABC são sistemas de transporte que variam no tamanho e na função para captar e/ou expulsar diversas substâncias (Linton e Higgins, 1998; Higgins, 2001; Harland *et al.*, 2005; Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; Burke e Ardehali, 2007), sendo necessários para o crescimento, sobrevivência, competitividade e patogenicidade bacteriana em diferentes ambientes (Nicolás *et al.*, 2007, Harland *et al.*, 2007).

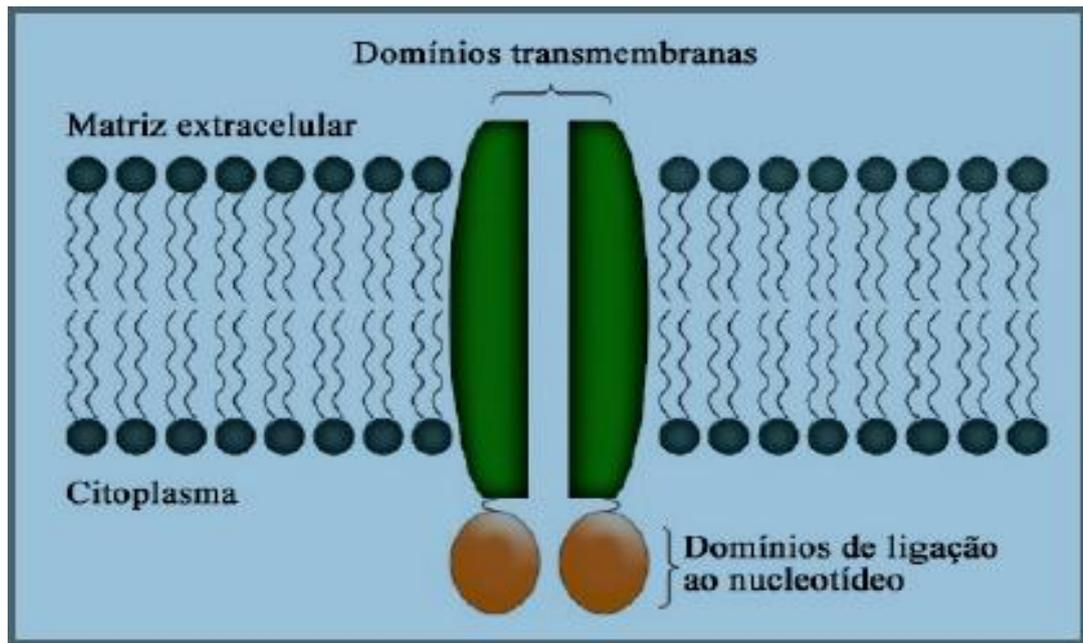


Figura 2. Representação esquemática de um típico transportador do tipo ABC em membrana celular. (Adaptada de Burke & Ardehal, 2007).

A importância destes sistemas de transporte muda de acordo com a espécie. Por exemplo, o genoma de *E. coli*, codifica 79 possíveis sistemas ABC, enquanto que em *Mycobacterium tuberculosis* o genoma codifica apenas 25. O ambiente onde estas duas bactérias são encontradas difere muito e, por isso, é considerado possível que o número de transportadores ABC seja diferente (Harland *et al.*, 2005).

O operon *proU* codifica um sistema de transporte de alta afinidade para betaína com alguma afinidade por prolina. O operon é formado por três genes *proV*, *proW* e *proX*, que correspondem a subunidades de uma proteína periplasmática de transporte de prolina dependente de ATP (Higgins, 1992). A expressão do operon *proU* é estimulada na transcrição por meio do aumento da osmolaridade (Gowrishankar, 1985; Cairney *et al.*, 1985; Dunlap e Csonka, 1985; Barron *et al.*, 1986;. Gutierrez *et al.*, 1987; May *et al.*, 1989).

Em *Escherichia coli* o transportador *proU* é ativado pelo choque osmótico (Faatz *et al.*, 1988). As proteínas *ProV* e *ProW* formam o sistema de translocação do complexo *ProU*, sendo que a proteína *ProW* apresenta uma cauda periplasmática particularmente longa que forma uma alfa hélice, e pode estar relacionada com a ativação do sistema em altas concentrações osmóticas. Já a proteína *ProX* corresponde à subunidade periplasmática, sendo responsável pela apresentação e transporte de glicina-betaína e prolina (Haardt e Bremer, 1996).

Sistemas de transporte de betaína de alta afinidade têm sido também descritos em *Staphylococcus aureus* (Bae *et al.*, 1993), a qual se caracteriza por apresentar tolerância à salinidade.

A ativação e a indução de sistemas de transporte de betaína tem sido documentada em diversas bactérias (Cairney *et al.*, 1985; May *et al.*, 1986; Mollenar *et al.*, 1993; Robert *et al.*, 2000), mostrando que dependendo da presença de betaína no sistema (alimentos e águas marinhas) a tolerância à salinidade pode ser alterada significativamente, permitindo a manutenção de células viáveis, e eventualmente o crescimento de *Aeromonas*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

No presente trabalho, foram utilizadas as linhagens de *Aeromonas* spp. pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (Quadro 1). Estas linhagens foram mantidas em meio Luria Bertani (LB) semi-sólido (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura 0,5% de cloreto de sódio; 1% de ágar; pH 7,2) a temperatura ambiente. Sendo feitos repiques destes microrganismos em intervalos de 60 dias, para a renovação deste banco.

Quadro 1. Linhagens de *Aeromonas* utilizadas no trabalho.

DENOMINAÇÃO	NOME CIENTÍFICO	ORIGEM
IBAer004	<i>Aeromonas media</i>	ATCC 33907
IBAer005	<i>Aeromonas salmonicida</i>	ATCC 33658
IBAer008	<i>Aeromonas caviae</i>	ATCC 15468
IBAer011	<i>Aeromonas trota</i>	ATCC 49657
IBAer012	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
IBAer015	<i>Aeromonas veronii</i>	ATCC 35624

ATCC: American Type Culture Collection.

Para a realização dos experimentos, foi utilizado o meio mínimo M9 (0,1% NH₄CL; 0,59% Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3% KH₂PO₄; 0,5% NaCl; 0,05% MgSO₄.7H₂O; 0,0015 % CaCl₂.2H₂O; 0,2% dextrose) e tampão fosfato salino (PBS) (0,02% KCL; 0,115% Na₂HPO₄.2H₂O; 0,02% KH₂PO₄; 0,5% NaCl) modificados de acordo com cada experimento.

3.2 Crescimento de *Aeromonas* sob condições de estresse salino

Para avaliação do crescimento em condições de estresse salino foram utilizadas as bactérias *A.trota* (ATCC 49657) e *A. hydrophila* (ATCC 7966). Estas bactérias foram crescidas em 10 mL de meio M9 com adição de 0,08M de NaCl a 35°C, por 24 horas. Estas

culturas foram utilizadas como inóculo, sendo transferido 100µL do inóculo para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio M9 com diferentes concentrações salinas (0,08; 0,17; 0,25; 0,34; 0,42; 0,51; 0,60 e 0,68M). Amostras foram retiradas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas para avaliar o crescimento bacteriano, e as leituras foram feitas por absorbância em 600 nm em espectrofotômetro ULTRASPEC 1000 (Pharmacia). Este experimento foi realizado em triplicata.

3.3 Avaliação do efeito osmoprotetor e osmolítico de betaína e colina sobre o crescimento de *Aeromonas* em diferentes concentrações de cloreto de sódio

Para determinação do efeito osmoprotetor e osmolítico de betaína e colina, inicialmente as linhagens de *A.trota* (ATCC 49657) e *A. hydrophila* (ATCC 7966), foram crescidas em de meio M9 com adição de 0,08M de NaCl a 35°C, por 24 horas sob agitação constante de 100 rpm, sendo estas culturas utilizadas como inóculo. Após o crescimento, cada inóculo foi transferido para meio M9 (1/100) com distintas concentrações salinas (0,08; 0,25; 0,34; 0,42 e 0,51M de NaCl) sem ou com adição de 1mM de betaína ou 1mM de colina. Para este teste, as amostras foram avaliadas quanto ao crescimento nos tempos 24 e 72 horas.

Com o intuito de aumentar o número de *Aeromonas* a ser avaliado, um novo experimento foi realizado, onde as bactérias *A. trota* (ATCC 49657), *A. hydrophila* (ATCC 7966), *A. media* (ATCC 33907), *A. salmonicida* (ATCC 33658), *A. caviae* (ATCC 15468) e *A. veronii* (ATCC 35624) foram então cultivadas em meio M9 por 24 horas a 35°C. Após o crescimento, estas bactérias foram inoculadas em meio M9 contendo diferentes concentrações de NaCl (0,08; 0,34; 0,51 e 0,68M), com ou sem adição de 1mM de betaína ou 1mM de colina. Estas amostras foram crescidas a 35°C e retiradas nos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas.

A avaliação do crescimento bacteriano em ambos os testes foi realizado através de leituras espectrofométricas a 600nm em aparelho Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4 Avaliação do efeito adaptativo na viabilidade celular, perda de proteínas e material genético em *Aeromonas* mantidas sob estresse salino.

As linhagens de *A. trota* (ATCC 49657) e *A. hydrophila* (ATCC 7966) foram crescidas em meio M9 com adição de 0,08M de NaCl e incubadas a 35°C por 24 horas, sendo estas culturas utilizadas como inóculo. Estes inóculos foram centrifugados a 9500 xg por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e estas células foram ressuspensas no mesmo volume de tampão PBS com diferentes concentrações de NaCl (0,08; 0,51; 1,02 e 2,04M). Foram coletadas amostras nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24 horas, sendo diluídas e plaqueadas, em placas de Petri contendo meio LB solidificado. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi realizada após 24 horas de incubação a 35°C. Para determinar a perda de componentes e proteínas, foram retiradas amostras e estas foram centrifugadas a 16500 xg por 5 minutos e os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até o momento das análises.

Para a avaliação do efeito da betaína sobre a viabilidade celular, perda de proteínas e material genético, as bactérias *A. trota* (ATCC 49657) e *A. hydrophila* (ATCC 7966) foram crescidas em meio M9 com adição de 0,08M de NaCl, acrescido ou não de 1mM de betaína, incubadas a 35°C por 24 horas, sem agitação. Após o crescimento as bactérias foram centrifugadas a 3000 xg por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados, as células foram lavadas três vezes com solução salina (0,9% NaCl) e novamente centrifugadas a 3000 xg por 10 minutos, sendo que na última lavagem houve um tempo de repouso de 30 minutos antes da centrifugação. Os sobrenadantes foram descartados e sobre estas células foi adicionado o mesmo volume de tampão PBS com diferentes concentrações de NaCl (0,08; 0,51; 1,02 e 2,04M), acrescido ou não de 1mM de betaína.

Foram retiradas amostras nos tempos 0, 3, 6 e 24 horas e a viabilidade celular foi avaliada através do plaqueamento em placas de Petri contendo meio LB solidificado com 1,8% de ágar. A contagem das UFC/mL foi realizada após 24 horas de incubação a 35°C. Para quantificar a perda de componentes e proteínas, amostras foram centrifugadas a 16500 xg por 5 minutos e mantidas a -20°C até o momento das análises.

A perda de componentes foi quantificada em espectrofotômetro ULTRASPEC 1000 (Pharmacia) a um comprimento de onda de 260 nm (Carson *et al.*, 2002) e a quantificação das proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), aonde foi possível avaliar a lise celular.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Avaliação da expressão do gene *proV* em *Aeromonas hydrophila*

3.5.1 Extração de RNA total

Para obtenção do RNA total, a linhagem ATCC 7966 foi crescida em distintas concentrações salinas (0,08; 0,17; 0,34M) em meio M9, a 35°C, por um período de 48 horas. Posteriormente, esta bactéria foi submetida à extração utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen™). Brevemente, 1,5mL desta cultura foram centrifugados a 16500 xg por 10min descartando o sobrenadante e preservando o *pellet* de células. Em seguida adicionou-se 1mL de TRIzol® ao *pellet* e o mesmo foi ressuscitado vigorosamente. O homogeneizado foi então incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e após adicionou-se 200 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por inversão e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Após este período as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi retirada e a ela adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico gelado. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C. O *pellet* obtido foi então lavado 1 vez com 1mL de etanol 75%, e seco em capela de exaustão. RNA total obtido foi ressuscitado em 100µL de água tratada com DEPC (0,1% dietilpirocarbonato) e quantificado em espectrofotômetro Ultraspec 1000 (Pharmacia Biotech) a um comprimento de onda de 260nm. A avaliação do grau de pureza do RNA extraído foi realizada utilizando a relação Abs260/Abs280nm e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™. Todas as amostras foram tratadas com DNaseI (Invitrogen™), para evitar contaminações por DNA. Para verificar a eficiência do tratamento utilizando DNaseI, um PCR foi realizado utilizando RNA como molde e um controle positivo empregando DNA. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™, onde foi confirmado a presença de amplificado apenas no controle positivo, evidenciando que as amostras tratadas com DNaseI continham apenas RNA.

3.5.2 Desenho dos *primers* para amplificação gene-específico (*proV*) e gene-referência (16S rRNA) através de *Real Time PCR* (qRT-PCR)

Todos os *primers* foram desenhados a partir de sequências de DNA de *Aeromonas* depositadas no GeneBank utilizando os programas BioEdit 7.0.5.3 e FastPCR 6.0. As sequências dos *primers* correspondentes a cada gene estão descritas no quadro 2.

Quadro 2. Sequência de primers utilizados para amplificação do gene *proV*.

<i>Primers</i>	Sequências (5'→3')	Tamanho do segmento amplificado
<i>proV</i>	CGGGGTCGTCTCCGGTGGAGT TCGACCACGGGCACCTGACA	159 pb
16S rRNA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGA CCGTACTCCCCAGGCGGTC	128 pb

3.5.3 Transcrição reversa para obtenção de cDNA

A partir do RNA total extraído, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™). As reações envolvendo a síntese de cDNA foram realizadas em um volume final de 20µL. Brevemente, cada reação inicialmente foi constituída por 1µL de Random Hexamer primers (50mM), 1µL de dNTPs (10mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 500ng de RNA total e o volume completado para 12µL com água tratada com DEPC. Esta reação foi misturada e incubada a 65°C por 5 minutos e imediatamente após mantida em gelo. Após esta incubação inicial, adicionou-se a reação 4µL de 5x *First-Strand Buffer*, 2µL de DTT (0,1M) e 1 µL de RNaseOUT™ (40U/ µL). A reação foi então misturada gentilmente e incubada a 37°C por 2 minutos. Em seguida, 1µL de *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV 200U/µL) foi adicionado à reação e esta incubada inicialmente a 25°C por 10 minutos seguida por uma nova incubação de 37°C por 50 minutos. Após este período a reação foi inativada por incubação de 15 minutos a 70°C. O cDNA obtido

foi então diluído na proporção de 1:250 e um RT-PCR foi realizado para a confirmação de sua síntese.

3.5.4 Amplificação por *Real time PCR* (qRT-PCR)

As reações de amplificação foram realizadas utilizando Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen™) em um volume total de 20µL. Brevemente, a reação de qRT-PCR foi constituída de 10µL de tampão Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG 2x, 10µM de cada primer; 4µL de água DEPC e 4µL de amostra de cDNA diluída em uma proporção de 1/250. As amplificações foram realizadas em Real-Time PCR System Applied Biosystems StepOne™ programado para os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos correspondentes a 95°C por 15 segundos e 61°C por 1 minuto. Para garantir a especificidade da amplificação foi realizada uma curva de desnaturação com temperatura variando de 61-95°C e acréscimo de 0,3°C por ciclo.

3.5.5 Análise dos resultados do qRT-PCR

A avaliação dos resultados foi realizada mediante análise da expressão comparativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de quantificação relativa é calculado com base no ΔCt (diferença entre o $Ct^{amostra}$ e o $Ct^{gene\ constitutivo}$), o $\Delta\Delta Ct$ é calculado pela diferença do $\Delta Ct^{amostra}$ em relação à média do $\Delta Ct^{controle}$ utilizado por fim para o cálculo empregando $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.6 Análises computacionais – Bioinformática

Com o auxílio do programa Blast foi feita uma análise comparativa das sequências dos genes *proV*, *proW* e *proX* que formam o operon *proU*. Assim como, uma análise comparativa das proteínas ProV, ProW e ProX de *Aeromonas* e outras bactérias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da tolerância a cloreto de sódio sobre o crescimento de *Aeromonas*

Visando determinar o efeito osmótico do cloreto de sódio sobre espécies do gênero *Aeromonas*, foi avaliado o crescimento de *A. trota* e *A. hydrophila* na presença de diferentes concentrações de cloreto de sódio. Quanto crescidas em meio definido (M9) foi possível observar que *A. trota* suportou concentrações salinas de até 0,42M, enquanto que *A. hydrophila* cresceu apenas até a concentração de 0,34M (Figura 3A e B). Este fato comprova que *A. hydrophila* (ATCC7966) tem uma deficiência adaptativa em comparação com *A. trota* (ATCC 49657) quando expostas a ambiente salino, corroborando aos resultados de Delamare *et al.* (1999), que em estudo da tolerância a salinidade em distintas espécies de *Aeromonas* constatou que todas as linhagens avaliadas foram capazes de crescer na presença de 0,34M de NaCl em meio completo, podendo ser consideradas halotolerantes. Segundo estes autores, quando comparadas as curvas de crescimento de *A. hydrophila* (ATCC7966) e *A. trota* (ATCC 49657) em quatro concentrações de NaCl (0,08, 0,34, 0,68 e 1,02 M), observou-se que, com o incremento de cloreto de sódio no meio as bactérias aumentam o tempo de latência (fase lag) e diminuem a velocidade de crescimento máximo e o número de células finais.

Vivekanandhan *et al.* (2003) examinaram os efeitos da concentração de NaCl em *A. hydrophila* e constataram que acima de 0,34M houve inibição parcial do crescimento e que algum crescimento ocorreu em concentrações de 0,68M de NaCl. No entanto, assim como no presente trabalho, nenhum crescimento ocorreu em concentrações acima de 0,68M, embora as células permanecessem viáveis. Estes resultados podem explicar a distribuição de *Aeromonas* em águas marinhas e seu desenvolvimento e manutenção em alimentos com NaCl como agente conservante.

Palumbo *et al.* (1985) estudaram o crescimento de isolados de *A. hydrophila* em caldo cérebro e coração e revelaram que a maioria dos isolados tolera 0,51M de NaCl, enquanto que apenas um número limitado cresce em 0,68M de NaCl. Da mesma forma, os estudos feitos por Knochel (1990) que mostraram que *Aeromonas* não tolera salinidade acima de 0,85M, reforçando assim os resultados deste estudo e mostrando que a salinidade pode atuar como fator limitante na proliferação desta bactéria.

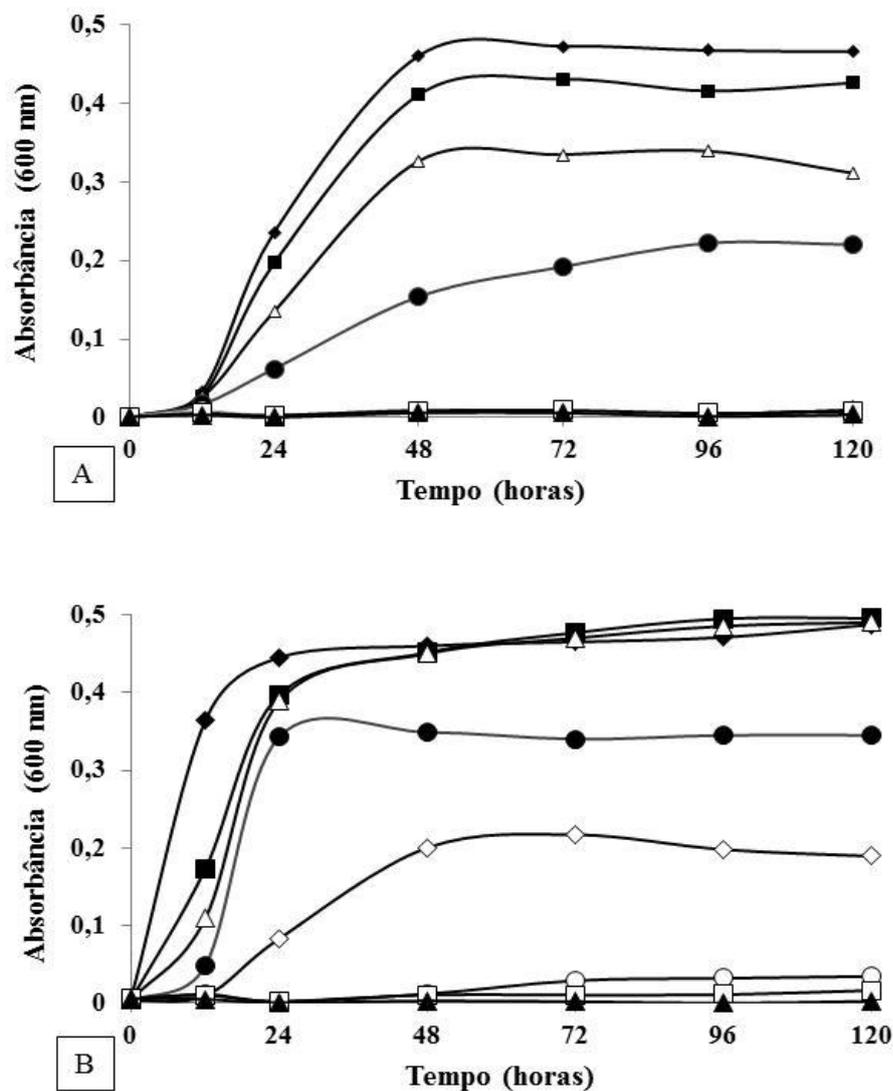


Figura 3. Crescimento de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (A) e *Aeromonas trota* ATCC 79657 (B) em meio M9 com distintas concentrações de NaCl.

Legenda: concentrações de cloreto de sódio: (◆) 0,085M; (■) 0,17M; (△) 0,25M; (●) 0,34M; (◇) 0,42M; (○) 0,51M; (□) 0,6M; (▲) 0,68M.

Segundo Csonka (1981) e Poolman e Glaasker (1998) o efeito mais importante de altas concentrações de cloreto de sódio sobre o desenvolvimento de *Aeromonas* provém do efeito osmótico inespecífico e não no efeito tóxico do sódio. Assim sendo, a diferença na tolerância à salinidade nas duas espécies de *Aeromonas* avaliadas deve estar relacionada ao ajuste da homeostase celular em condições de alta osmolaridade, através da produção de osmolitos ou incorporação de osmoprotetores.

4.2 Efeito osmoprotetor da betaína e da colina em *Aeromonas*

Ensaio realizado por Delamare (2004) mostrou ocorrência de maior tolerância à salinidade em *Aeromonas* quando crescidas em meio completo (LB) do que quando crescidas em meio mínimo (M9). Esta diferença foi atribuída à presença de compostos osmoprotetores no meio completo. Assim, passou-se a avaliar a tolerância à salinidade de *A. hydrophila* e *A. trota* em meio mínimo (M9) acrescido do osmoprotetor betaína e do seu precursor, colina.

Os resultados mostraram que, na presença do osmoprotetor betaína, tanto *A. hydrophila* quanto *A. trota* apresentam um incremento na tolerância à salinidade, crescendo em meio contendo 0,42 e 0,51 M de NaCl, respectivamente. Já na presença de colina não foi constatado nenhum incremento na tolerância à salinidade (Figura 4).

A tolerância à salinidade em bactérias pode estar associada ao aumento da concentração intracelular de certos solutos, garantindo que a osmolaridade interna seja maior do que a externa e que o turgor da célula seja, portanto, mantido. Estes solutos podem ser sintetizados pelas bactérias (osmolitos) ou obtidos a partir do meio (osmoprotetores). Neste sentido, os resultados obtidos indicam que, em *Aeromonas*, a betaína tem efeito osmoprotetor, enquanto a colina não mostrou função nem como osmoprotetor nem como precursor de osmolitos.

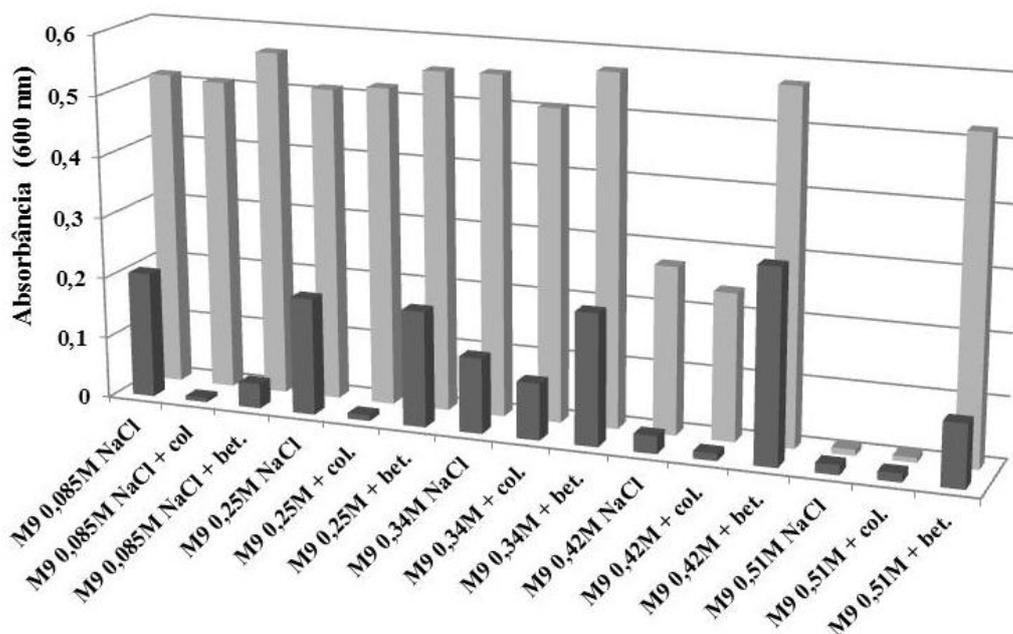


Figura 4. Crescimento de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) e *Aeromonas trota* (ATCC 79657) em distintas concentrações de cloreto de sódio com e sem colina e betaína.

Legenda: (■) *A. hydrophila*; (□) *A. trota*.

Delamare *et. al.* (2003) avaliaram o efeito de solutos orgânicos no crescimento de *A. trota* e *A. hydrophila*. Os autores constataram que a betaína exerceu osmoproteção permitindo o crescimento de ambos os microrganismos em concentrações inibitórias de NaCl. Segundo os mesmos autores, a cinética de crescimento sugere que a diferença de halotolerância entre linhagens está associada à capacidade de acúmulo de betaína. A betaína, uma amina metilada, tem sido identificada como importante osmoprotetor para distintas espécies de bactérias (Le Rudulier *et. al.*, 1984; Robert *et. al.*, 2000; White, 2000). Em *E.coli*, o acúmulo intracelular de betaína depende de sua síntese a partir de colina ou da sua captação a partir do meio mediada pelo sistema ProU (Culham *et al.*, 2001).

A partir da disponibilização do genoma completo de algumas espécies do gênero *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. salmonicida* e *A. veronii*) foi possível avaliar a presença do operon proU. Este operon está bem conservado dentro deste gênero e mesmo em outras bactérias Gram negativas (Tabela 1). O alto grau de conservação deste operon pode ser justificado pela sua importância tanto no transporte de prolina (nutrição bacteriana) como de betaína (osmotolerância).

Tabela 1. Conservação do operon proU em bactérias.

Gene	Linhagem	Cobertura (%)	E value	Máxima identidade (%)	Acesso
<i>proV</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	100	0,0	100	CP000462.1
	<i>Aeromonas salmonicida</i> A449	100	0,0	87	CP000644.1
	<i>Dickeya dadantii</i> 3937	60	2e-132	79	CP002038.1
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	60	2e-132	79	AF494101.1
	<i>Dickeya dadantii</i> Ech703	60	1e-128	79	CP001654.1
	<i>Dickeya zae</i> Ech1591	57	3e-111	78	CP001655.1
	<i>Dickeya dadantii</i> Ech586	55	3e-106	78	CP001836.1
	<i>Pseudomonas putida</i> S16	52	3e-100	78	CP002870.1
	<i>Halorhodospira halophila</i> SL1	53	6e-68	75	CP000544.1
<i>Rhodospirillum rubrum</i> F11	55	1e-60	74	CP003046.1	
<i>proW</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966	100	0,0	100	CP000462.1
	<i>Aeromonas salmonicida</i> A449	97	0,0	84	CP000644.1
	<i>Delftia</i> sp Cs1-4	57	2e-132	80	CP002735.1
	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	57	8e-131	80	CP000884.1
	<i>Serratia marcescens</i> WW4	53	2e-126	80	CP003959.1
	<i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601	48	4e-119	81	CP002657.1
	<i>Alicyclophilus denitrificans</i> BC	48	4e-119	81	CP002449.1
	<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC9394	48	4e-109	80	FP929040.1
	<i>Klebsiella variicola</i> At-22	48	1e-108	80	CP001891.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	48	1e-108	80	CP000964.1	

<i>proX</i>					
<i>proX</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966	100	0,0	100	CP000462.1
	<i>Aeromonas salmonicida</i> A449	100	0,0	85	CP000644.1
	<i>Serratia marcescens</i> WW4	51	3e-70	77	CP003959.1
	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	59	8e-56	74	CP000884.1
	<i>Delftia sp</i> Cs1-4	59	2e-52	74	CP002735.1
	<i>Enterobacter cloacae</i> SCF1	46	3e-30	73	CP002272.1
	<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3	33	2e-12	84	CP002600.1
	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	8	3e-10	83	CP000441.1

Ao comparar-se o mapa genético das três espécies de *Aeromonas* sequenciadas até o presente, foi possível observar que *A. hydrophila* e *A. salmonicida* apresentam o operon policistrônico *proU* completo com a sequência *proV*, *proW* e *proX*, localizado entre os genes *folA* e *cysH*. É interessante observar que a posição do operon *proU* entre os genes *folA* e *cysH*, ou os seus homólogos, é comum em diversas bactérias Gram negativas (*S. marcescens*, *Burkholderia gladioli* e *Klebsiella pneumoniae*). Por outro lado, a linhagem *A. veronii* B565 não apresenta o operon *proU* no seu genoma, tendo apenas uma região não codificador de 80pb entre os genes *folA* e *cysH* (Figura 5). Cabe ressaltar que este é um caso muito especial, já que na linhagem AMC34 de *A. veronii* é possível constatar a presença de proteínas com alta identidade com ProV, ProW e ProX de *A. hydrophila*. (Tabela 2).

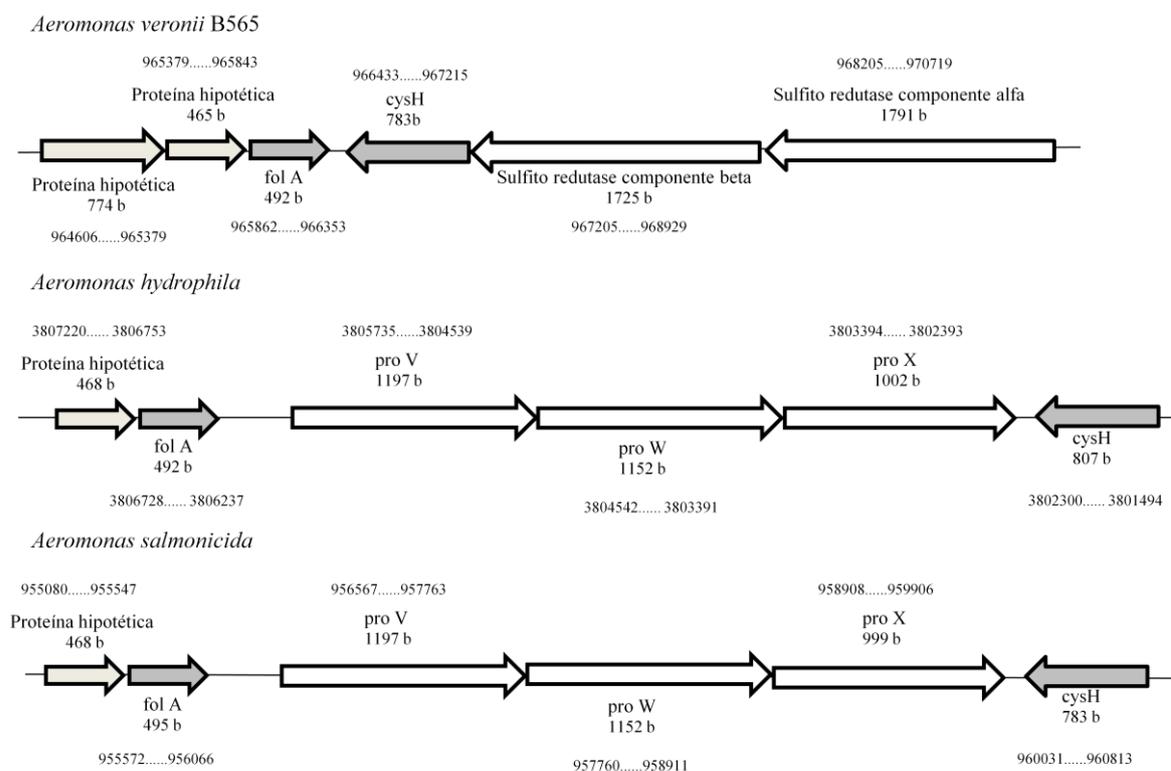


Figura 5. Esquema do operon *proU* em *Aeromonas*.

De acordo com a anotação dos genomas de *A. hydrophila*, *A. salmonicida* e *A. veronii*, apenas *A. veronii* apresenta o gene codificante da enzima colina desidrogenase, responsável pela síntese de betaína a partir de colina. Assim sendo, foi realizado um experimento visando avaliar o efeito de colina e de betaína na halotolerância de distintas espécies de *Aeromonas*. Para tanto, as bactérias foram crescidas na presença e ausência de colina e de betaína em distintas concentrações de cloreto de sódio, sendo o pré-crescimento com e sem betaína e colina.

Tabela 2. Análise comparativa das proteínas do operon proU de *Aeromonas hydrophila* e outras bactérias.

Proteína	Linhagem	Cobertura (%)	E value	Máxima identidade (%)	Máxima positividade (%)	Acesso
ProV	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	100	0,0	100	100	YP_857865.1
	<i>A. veronii</i> AMC34	100	0,0	99	99	ZP_17194382.1
	<i>A. aquariorum</i> AKK1	100	0,0	99	99	ZP_11384510.1
	<i>A. hydrophila</i> SSU	100	0,0	97	99	ZP_17182059.1
	<i>A. caviae</i> Ae398	100	0,0	97	99	ZP_08521536.1
	<i>A. media</i> WS	99	0,0	96	98	ZP_15943687.1
	<i>A. salmonicida</i> A449	99	0,0	93	96	YP_001140815.1
	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909	99	0,0	70	84	ZP_04638044.1
	<i>Dickeya dadantii</i> Ech586	99	0,0	70	84	YP_003334819.1
<i>Yersinia enterocolitica</i> 8081	99	0,0	70	84	YP_001005263.1	
ProW	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	100	0,0	100	100	YP_857864.1
	<i>A. veronii</i> AMC34	100	0,0	98	99	ZP_17194381.1
	<i>A. aquariorum</i> AAK1	100	0,0	94	96	ZP_11384511.1
	<i>A. hydrophila</i> SSU	100	0,0	94	95	ZP_17182060.1
	<i>A. caviae</i> Ae398	100	0,0	91	94	ZP_08521535.1
	<i>A. salmonicida</i> A449	93	0,0	89	93	YP_001140816.1
	<i>A. media</i> WS	93	0,0	91	93	ZP_15943688.1
	<i>Providencia sneebii</i> DSM19967	89	5e-153	66	78	ZP_16368562.1
	<i>Vibrio anguillarum</i> 775	86	3e-149	64	80	YP-004577588.1
	<i>Morganella morganii</i> KT	89	1e-148	65	77	ZP_15939521.1
ProX	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	100	0,0	100	100	YP_857863.1
	<i>A. aquariorum</i> AAK1	100	0,0	95	98	ZP_11384512.1
	<i>A. hydrophila</i> SSU	100	0,0	96	99	ZP_17182061.1
	<i>A. veronii</i> AMC34	100	0,0	98	99	ZP_17194380.1
	<i>A. caviae</i> Ae398	92	0,0	91	96	ZP_08521534.1
	<i>A. salmonicida</i> A449	92	0,0	89	94	YP_001140817.1
	<i>A. media</i> WS	90	0,0	92	95	ZP_15943689.1
	<i>Proteus penneri</i> ATCC35198	97	6e-149	61	77	ZP_03806563.1
	<i>Proteus mirabilis</i> HI4320	96	7e-149	61	76	YP_002150182.1
	<i>Providencia stuartii</i> MRSN2154	93	1e-147	63	78	YP_006217569.1
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC29906	96	2e-147	60	76	ZP_03842874.1
	<i>Providencia stuartii</i> ATCC25827	93	4e-147	63	77	ZP_02959585.1

Os resultados (Tabelas 3 e 4) mostraram que a colina, em pré-tratamentos ou durante o crescimento em estresse salino, não exerce efeito sobre a halotolerância em *Aeromonas*, fato que sugere que o gene da colina desidrogenase não é ativo ou não está presente nas linhagens testadas. Por outro lado, conforme mostram os dados apresentados nas tabelas 3 e 4, a betaína possibilitou o crescimento de *A. trota* em meio M9 contendo 0,68M de NaCl, enquanto *A. media*, *A. caviae* e *A. hydrophila* cresceram em 0,51M de NaCl. Entretanto, *A. salmonicida* e *A. veronii* cresceram em 0,34M de NaCl somente na presença do osmoprotetor betaína. Constatou-se que, quando a osmolaridade do meio foi elevada com NaCl, o crescimento das linhagens bacterianas foi estimulado pela adição de betaína, mostrando que esse derivado de aminoácido reverte a inibição de crescimento provocada por estresse osmótico. A betaína, como foi mostrado em ensaios anteriores, tornou possível o crescimento das bactérias em concentrações superiores às toleradas na ausência do osmoprotetor. Dados semelhantes foram relatados por Delamare *et. al.* (2003).

Tabela 3. Efeito da betaína sobre o tempo de fase de adaptação (lag) de *Aeromonas* crescidas em altas concentrações de cloreto de sódio.

		0,085 M NaCl		0,34 M NaCl		0,51 M NaCl		0,68 M NaCl	
		s/ osmop	betaina	s/ osmop	betaina	s/ osmop	betaina	s/ osmop	betaina
<i>A. salmonicida</i>	s/ pré-trat	6	6	12	6	ac	ac	ac	ac
	betaina	6	6	6	6	ac	ac	ac	ac
<i>A. media</i>	s/ pré-trat	6	6	10	6	ac	22	ac	ac
	betaina	6	6	6	6	22	22	ac	ac
<i>A. trota</i>	s/ pré-trat	6	6	6	6	ac	12	ac	12
	betaina	6	6	6	6	10	10	ac	12
<i>A. veronii</i>	s/ pré-trat	7	7	ac	7	ac	ac	ac	ac
	betaina	7	7	7	7	ac	ac	ac	ac
<i>A. caviae</i>	s/ pré-trat	5	5	12	7	ac	ac	ac	ac
	betaina	5	5	6	6	8	7	ac	ac
<i>A. hydrophila</i>	s/ pré-trat	7	7	7	7	ac	12	ac	ac
	betaina	6	6	6	6	10	10	ac	ac

Legenda: ac = ausência de crescimento, s/osmop = crescimento sem adição de osmoprotetor, s/pré-tratamento = sem adição de osmoprotetor no pré inoculo, betaina = pré inoculo e/ou crescimento com adição de 1 mM de betaina

De um modo geral, os dados das Tabelas 3 e 4 mostram que o osmoprotetor betaína é incorporado na célula bacteriana durante o crescimento do inóculo na ausência de estresse osmótico; tal acúmulo determina um aumento na tolerância (tempo de fase lag e crescimento) quando estas células são transferidas para sistemas com maior concentração de NaCl. Da mesma forma, a presença de betaína durante, o crescimento em condição de estresse, eleva o nível de tolerância (tempo de fase lag e crescimento) em todas as bactérias avaliadas,

indicando que a incorporação do osmoprotetor, e conseqüente manutenção da homeostase celular, ocorre rapidamente. Neste particular, vale ressaltar o resultado obtido com a bactéria osmotolerante *A. trota*, em que foi constatado crescimento em 0,68M NaCl apenas em meio contendo betaína independentemente do sistema de produção do pré-inóculo (Tabelas 3 e 4).

Tabela 4. Efeito da betaína sobre absorvância máxima (600nm) de *Aeromonas* crescidas em altas concentrações de cloreto de sódio.

		0,085 M NaCl		0,34 M NaCl		0,51 M NaCl		0,68 M NaCl	
		s/ osmop	betaina	s/ osmop	betaina	s/ osmop	betaina	s/ osmop	betaina
<i>A. salmonicida</i>	s/ pré-trat	0,79 (24)	0,87 (24)	0,09 (24)	0,87 (24)	ac	ac	ac	ac
	betaina	0,83 (24)	0,84 (24)	0,71 (24)	0,83 (24)	ac	ac	ac	ac
<i>A. media</i>	s/ pré-trat	0,90 (24)	0,95 (24)	0,50 (24)	0,53 (24)	ac	0,43 (72)	ac	ac
	betaina	0,84 (24)	0,82 (24)	0,69 (24)	0,53 (24)	0,17 (48)	0,38 (48)	ac	ac
<i>A. trota</i>	s/ pré-trat	0,87 (24)	0,94 (24)	0,76 (24)	0,80 (24)	ac	0,90 (72)	ac	0,15 (72)
	betaina	0,96 (24)	0,96 (24)	0,95 (24)	0,90 (24)	0,17 (24)	0,82 (48)	ac	0,25 (48)
<i>A. veronii</i>	s/ pré-trat	0,73 (24)	0,76 (24)	ac	0,65 (24)	ac	ac	ac	ac
	betaina	0,79 (24)	0,84 (24)	0,26 (24)	0,72 (48)	ac	ac	ac	ac
<i>A. caviae</i>	s/ pré-trat	0,71 (24)	0,70 (24)	0,70 (24)	0,69 (24)	ac	ac	ac	ac
	betaina	0,73 (24)	0,71 (24)	0,68 (24)	0,79 (24)	0,18 (24)	0,60 (48)	ac	ac
<i>A. hydrophila</i>	s/ pré-trat	0,56 (24)	0,53 (24)	0,25 (24)	0,50 (48)	ac	0,30 (72)	ac	ac
	betaina	0,54 (24)	0,54 (24)	0,43 (24)	0,69 (48)	0,06 (48)	0,37 (48)	ac	ac

Legenda: ac = ausência de crescimento, s/osmop = crescimento sem adição de osmoprotetor, s/pré-tratamento = sem adição de osmoprotetor no pré inóculo, betaina = pré inóculo e/ou cresciendo com adição de 1 mM de betaína; (horário em que a D.O. atengiu o valor máximo em horas)

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que na ausência de estresse osmótico, a bactéria *A. hydrophila* mantém uma expressão basal do gene *proV*, membro do operon *proU* responsável pelo transporte de prolina e betaína (Faatz et al.,1988; Higgins, 1992). Por outro lado, mesmo sob estresse moderado (0,17M NaCl), observa-se um aumento expressivo de transcrição do gene *proV*, atingindo 15x e 9x na ausência e presença de betaína, respectivamente. Esta diferença de expressão pode ser atribuída ao menor estresse celular decorrente do acúmulo de betaína. A maior expressão relativa (64x) foi observada no meio contendo 0,34M NaCl e 1mM betaína, concentração salina na qual *A. hydrophila* apresenta crescimento limitado na ausência do osmoprotetor. A alta expressão neste meio, comparado com aquele contendo 0,17M de NaCl e 1mM de betaína pode ser atribuída ao maior requerimento de betaína intracelular para estabilização da homeostase celular.

Como um todo, os dados de expressão do gene *proV* em *A. hydrophila* adaptadas por 48h (Figura 6), indicam que o estresse osmótico exerce efeito indutor da transcrição do operon *proU*, independentemente da presença ou não de betaína.

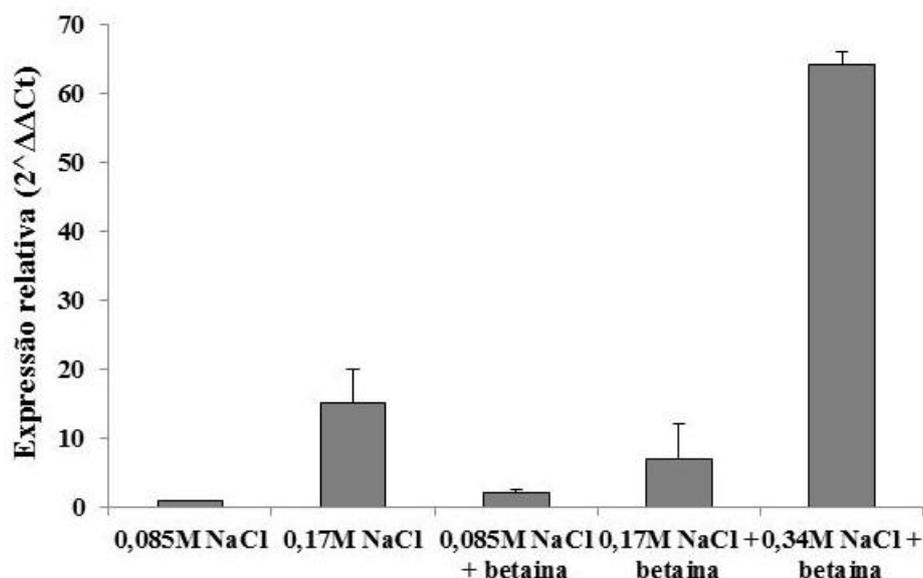


Figura 6. Expressão do gene *proV* de *Aeromonas hydrophila* crescidas em condições de estresse osmótico por 48h.

De um modo geral, estes resultados corroboram aos de LeRudulier e Bouillard (1983), que observaram que a betaína é um potente osmoprotetor para diversas espécies da família Enterobacteriaceae, e de Perroud e LeRudulier (1985), que mostraram que a concentração intracelular de betaína em *E. coli* é proporcional à osmolaridade do meio, sendo o seu transporte estimulado pelo estresse osmótico em diversas famílias bacterianas.

4.3 Efeito do estresse osmótico sobre a viabilidade celular, perda proteica e de material genético em *Aeromonas*

Quando a célula bacteriana é submetida a choques osmóticos, muitas modificações ocorrem dependendo da severidade do choque: inativação enzimática, modificações no pH intracelular, perda de constituintes, modificação de fluidez de membrana e morte celular por desidratação, entre outras (Csonka, 1989). Assim, passou-se a avaliar o efeito do choque osmótico em concentrações de 0,08, 0,51, 1,02 e 2,04M de NaCl sobre *A. hydrophila* e *A. trota*.

Conforme pode ser observado na Figura 7, após 6 horas na presença de 1,02M de NaCl *A. hydrophila* apresentou redução de 3 log na viabilidade, não sendo recuperadas bactérias viáveis após 24 horas de estresse osmótico. Já em *A. trota* só foi possível observar redução da viabilidade apenas após 24h em 2,04M de NaCl. A redução da viabilidade celular

foi distinta nas duas bactérias avaliadas, sendo menor em *A. trota*, bactéria que em testes anteriores mostrou maior tolerância à salinidade.

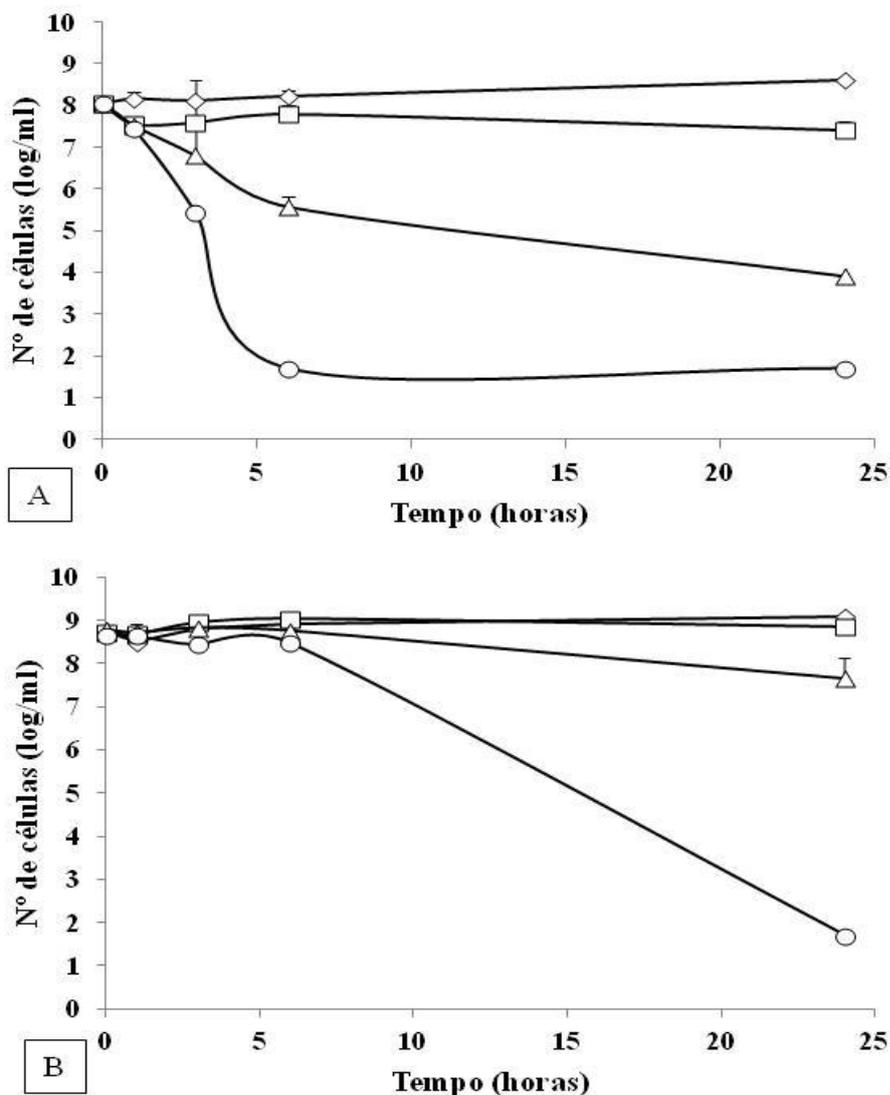


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (A) e *Aeromonas trota* ATCC 49657 (B) em distintas concentrações de cloreto de sódio.

Legenda: (◇) 0,08M; (□) 0,51M; (△) 1,02M; (○) 2,04M de cloreto de sódio.

Delamare *et. al* (2003) avaliaram a viabilidade celular de *A. trota* e *A. hydrophila* após choque osmótico com concentrações de 0,51, 1,02 e 2,56M de NaCl e constataram que a viabilidade celular teve redução progressiva dependendo da concentração de NaCl utilizada e do tempo de exposição ao choque osmótico.

Quanto à perda de componentes intracelulares, foi possível observar que tanto *A. hydrophila* quanto *A. trota* perderam componentes A_{260} após 6h de estresse osmótico, com

importante aumento após 24 h (Figura 8). Em *A. hydrophila* foi constatada perda de componentes A_{260} dependente da concentração de NaCl presente no sistema.

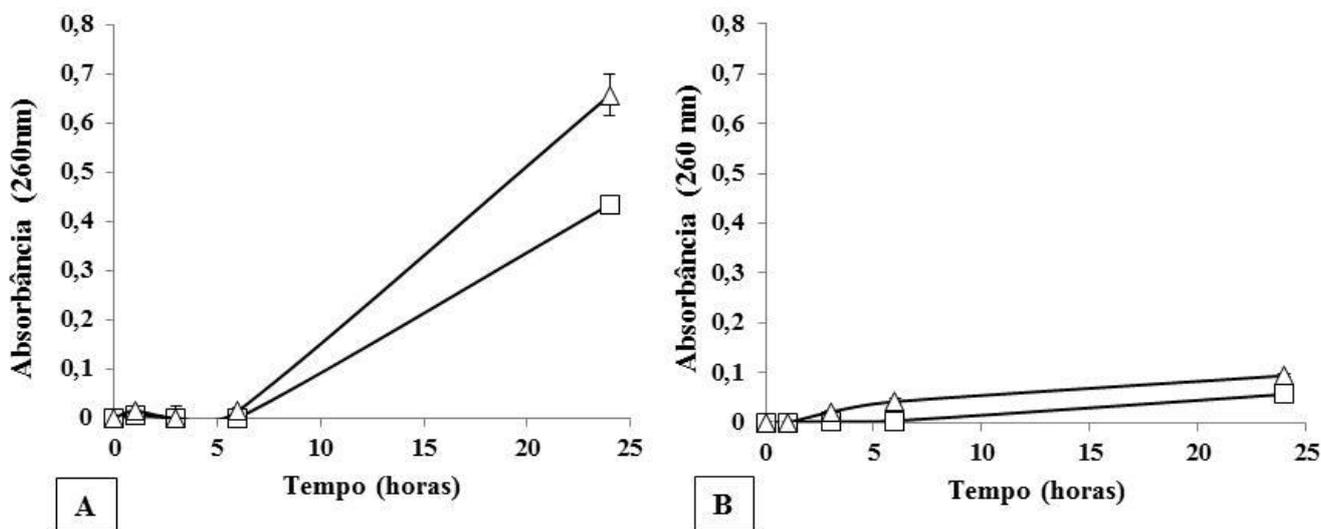


Figura 8. Determinação da perda de material genético em *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (A) e *Aeromonas trota* ATCC 49657 (B) em distintas concentrações de cloreto de sódio.

Legenda: (□) 1,02M; (△) 2,04M de cloreto de sódio

A perda de componentes A_{260} foi proporcional à concentração de NaCl. Estes parâmetros são indicativos de lise celular ou de modificações estruturais de membrana que possibilitam a liberação de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas). A estimativa da concentração de DNA depende do tipo e quantidade de amostra disponível. Para amostras com certo grau de pureza, com baixo nível de contaminação por proteínas, fenóis, polissacarídeos, álcool, ou outros ácidos nucléicos, a estimativa por espectrofotômetro, medida pela absorbância das bases a 260 nm consiste num método simples, rápido e com boa precisão. Já quando avaliada, perda proteica por Bradford não foi constatado nenhum incremento na perda de proteína em comparação com as células mantidas em 0,08M de cloreto de sódio, o que pode estar relacionado com o nível de precisão do método.

Quando analisado o efeito do crescimento prévio com 1mM de betaína sobre a viabilidade celular em altas concentrações salinas, não foi possível observar diferenças na resposta celular quando estas células foram transferidas para 2,04M de cloreto de sódio (Figura 9). Este fato também foi evidente quando as células foram submetidas a estresse salino com e sem a adição de 1 mM de betaína mais 2,04M de cloreto de sódio. Já na concentração de cloreto de sódio de 1,02M, foi possível evidenciar que tanto em *A.*

hydrophila (9A e B) quanto em *A. trota* (9C e D) apresentaram um incremento na viabilidade celular quando pré-crescidas com betaína. Este efeito protetor deve estar associado ao acúmulo de betaína durante o crescimento celular, reduzindo, portanto, o efeito do choque osmótico e limitando a plasmólise.

Estes resultados são importantes considerando que, dependendo da presença de betaina no sistema (alimentos, água marinha, entre outros), a tolerância à salinidade pode ser alterada, permitindo a manutenção de células viáveis, e eventualmente o crescimento de *Aeromonas*.

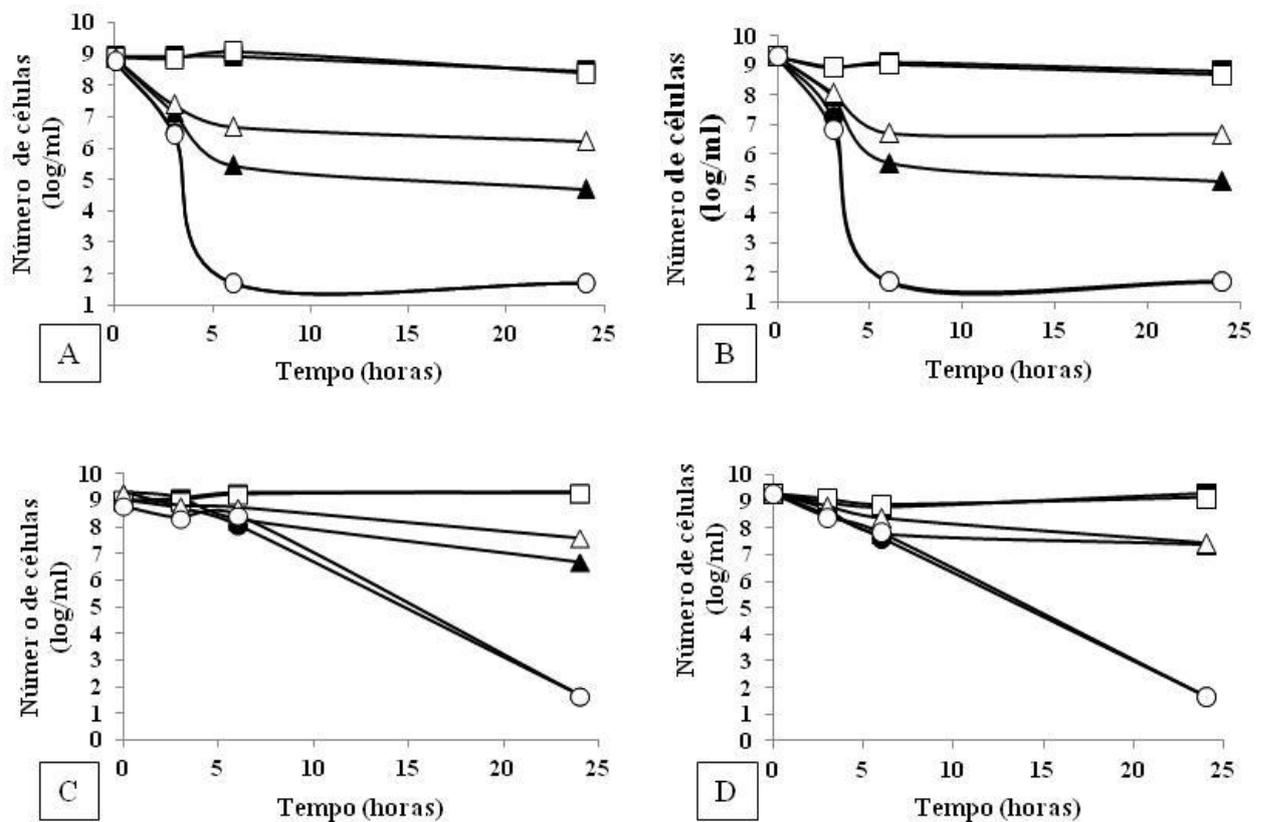


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (A e B) e *Aeromonas trota* ATCC 49657 (C e D) em distintas concentrações de cloreto de sódio, (A) e (C) sem pré tratamento, (B) e (D) com pré tratamento.

Legenda: (◇) 0,08M; (□) 0,51M; (△) 1,02M; (○) 2,04M de cloreto de sódio; símbolos sem preenchimento são com adição de 1 mM de betaína e símbolos com preenchimento são sem adição de betaína durante o pós tratamento.

A betaína pode ser considerada como um agente osmoprotetor em *Aeromonas*, como ocorre em outras espécies bacterianas. Esse fato já havia sido confirmado por Delamare *et al.* (2003), através de ressonância magnética nuclear (NMR) de extratos celulares, a presença de

betaína intracelular em *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. trota* ATCC 49657 crescidas em concentrações salinas de 0,08 e 0,34 M na ausência ou presença de betaína. Os resultados indicaram que ambas bactérias acumulam betaína no seu interior quando crescidas na presença deste derivado de aminoácido, especialmente quando em altas concentrações salinas.

Quanto à perda de componentes A_{260} , observou-se que as duas linhagens avaliadas apresentaram um comportamento semelhante ao observado na ausência de pré e pós tratamento com 1 mM de betaína (Figura 9). Estes resultados indicam que se por um lado a betaína atua na manutenção do turgor celular, garantindo a manutenção da viabilidade e eventualmente o crescimento celular, este osmoprotetor não evita as alterações de membrana que levam à perda de componentes celulares.

A partir dos resultados obtidos, foi avaliada a expressão do gene *proV* em *A. hydrophila* quando mantidas em concentrações de até 0,68M de cloreto de sódio. Cabe ressaltar que, nesta concentração de cloreto de sódio, não foi evidenciado decaimento na viabilidade celular por até 3 horas. Na avaliação da expressão de *proV*, foi possível observar um aumento da expressão deste gene nas concentrações 0,34M e 0,68M, o que indica que a expressão do operon *proU*, envolvido no transporte de osmoprotetores, é estimulada por estresse osmótico (Figura 10). Conforme pode ser visualizado, quanto maior o estresse 0,34M → 0,68M maior é a expressão de *proV*. Por outro lado, na presença do osmoprotetor betaína, a expressão de *proV* é menor do que na sua ausência. Com 0,34M de NaCl e betaína, a expressão de *proV* é basal (igual ao controle), mostrando que a quantidade constitutiva de transportadores presentes na célula é capaz de elevar rapidamente a concentração de betaína intracelular evitando o estresse osmótico e a resposta celular ao mesmo. Já com 0,68M de NaCl e betaína, observa-se aumento na expressão de *proV*, porém menor do que o evidenciado na ausência do osmoprotetor. Além disso, a redução na expressão de *proV* após 60 minutos, em sistema contendo 0,68M de NaCl e betaína indica que depois de atingir uma quantidade suficiente de transportadores e uma determinada concentração de betaína intracelular, a bactéria recupera a homeostase celular e volta gradativamente a uma condição basal de expressão do operon *proU*.

Em conjunto estes dados indicam que a expressão do operon *proU* é estimulada pelo estresse osmótico em nível celular e não pela presença de betaína ou de NaCl extracelular.

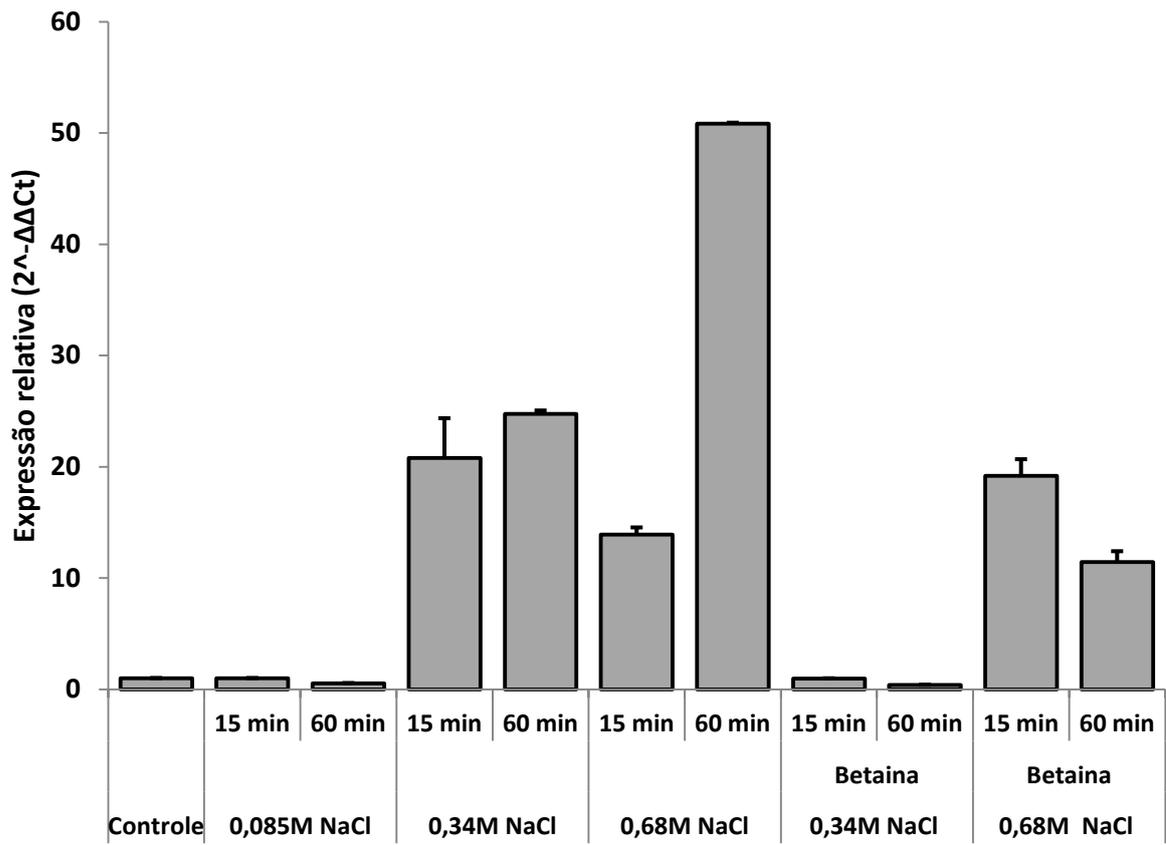


Figura 10. Expressão do gene *proV* de *Aeromonas hydrophila* em sistema adaptativo de estresse salino.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

- . *Aeromonas trota* apresenta mais tolerância à salinidade do que *Aeromonas hydrophila*, sendo que, algumas espécies de *Aeromonas* podem crescer em sistemas contendo até 0,42M de NaCl, concentração utilizada como agente de preservação de alimentos;
- . a betaina atua como osmoprotetor em *Aeromonas*, determinando a sua capacidade de sobrevivência e crescimento em concentrações inibitórias de cloreto de sódio;
- . a colina, considerada importante osmoprotetor em algumas bactérias, não apresenta tal efeito em *Aeromonas*;
- . *Aeromonas* acumula betaína mesmo na ausência de estresse salino, determinando uma pré-adaptação às mudanças de osmolaridade;
- . em *A. hydrophila*, o estresse osmótico determina um aumento significativo na expressão do operon proU, responsável pelo transporte de betaína, mesmo na ausência do osmoprotetor;
- . a expressão do operon proU em *A. hydrophila* é modulada pelo estresse intracelular, de tal forma que a mesma volta a níveis próximos do basal quando a célula atinge a homeostase;
- . a análise bioinformática do operon proU, responsável pelo transporte de betaína, mostra elevada conservação do mesmo em bactérias, indicando a importância deste transportador ABC.

- Bae, J.; Anderson, S. H.; Miller, K. (1993). Identification of a high-affinity glycine-betaine transport system in *Staphylococcus aureus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 2734-2736.
- Barron, A.; May, G.; Bremer, E. and Villarejo, M. (1986). Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 67: 433-438.
- Biemans-Oldehinkel, E.; Doeven, M. K.; Poolman, B. (2006). ABC Transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. **FEBS Letters.** 580: 1023-1035.
- Blair, I. S.; Mac Mahon, M. A. S.; Mc Dowell, D. A. (1999). *Aeromonas*. Studies Research Unit, University of Ulster at Jordanstown, Co. Antrim, Northern Ireland.
- Boch, J.; Kempf, B.; Schmid, R. and Bremer, E.; (1996). Synthesis of the Osmoprotectant Glycine Betaine in *Bacillus subtilis*: Characterization of the gbsAB Genes. **J. Bacteriol.** 178: 5121-5129.
- Boch, J.; Nau-Wagner, G.; Bremer, S. K. E. (1997). Glycine Betaine aldehyde-dehydrogenase from *Bacillus subtilis* characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. **Arch. Microbiol.** 168: 282-289.
- Bohnert, H. J.; Nelson, D. E.; Jensen, R. G. (1995). Adaptation to Environmental Stresses. **Plant Cell**, 7: 1099-1111.
- Borrel, L. N.; Borrel, L. N.; Acinas, S. G.; Figueras, M. J.; Martínez-Murcia, A. J. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by Restriction Fragment Length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. **J. Clin. Microbiol.** 35:1671-1674.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brandi, G.; Sisti, M.; Schiavano, G. F.; Salvaggio, L.; Albano, A. (1996). Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. **J. Appl. Bacteriol.** 81:439-444.
- Bremer, E. and Kramer, R. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. **In Bacterial Stress Responses**, pp. 79-97.
- Burk, V.; Robinson, J.; Gracey, M.; Peterson, D. and Partridge K. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1671-1674.

- Burke, M. A.; Ardehali, H. (2007). Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. **Trans. Research.** 150: 73-80.
- Cairney, J.; Booth, I. R.; and Higgins, C. F. (1985). Osmoregulation of gene expression in *Satmonetta typhmuri*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. **J. Bacteriol** 164:1224-1232.
- Cansian, R. L; Floriani, S. T; Valduga, E. (2005). Microbiological Analysis of Critical Points in the Chicken Industry. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 48: 403-406.
- Carmel, O.; Dover, N.; Rahav-Manor, O.; Dibrov, P.; Kirsch, D.; Karpel, R.; Schuldiner, S.; Padan, E. (1994). A single aminoacid substitution (Glu134>ala) in NhaR1 increases the inducibility of Na⁺ of the product of *nhaA*, a Na⁺/H⁺ antiporter gene in *Escherichia coli*. **EMBO J.** 13: 1981-1989.
- Carnahan, A.M. and Altwegg, M. (1996). **Taxonomy.** In: Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J.; Joseph, S.W. (Ed.). The Genus *Aeromonas*. John Wiley & Sons, New York, NY. p. 1-38.
- Carneiro, M. S.; Rossi Júnior, O. D. (2006). Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arq. Inst. Biol.**, 73: 271-276.
- Carson, C. F.; Mee, B. J.; Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46: 1914-1920.
- Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M. J; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Rernández-Rendón, E.; Aparício, G. O; Guarro, J.; Chacón, M. R (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. Isolated from Frozen Fish Intended for Human Consumption in México. **Int. J. Food Microbiol.** 84: 41-49.
- Cattani, F. (2008). Estudo do transporte de oligopeptídeos em *Aeromonas hydrophila* e comparação com outras espécies do gênero. **Dissertação de Mestrado.** Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- Chen, W.; Lee, T. M.; Lan, C. C.; Cheng, C. P. (2000). Characterization of halotolerant rhizobia isolated from root nodules of Canavalia rosea from seaside areas. **FEMS Microbiol. Ecol.** 34: 9-16.

- Chen, W.; Wang, E.; Wang, S.; Li, Y. (1985). Characteristics of *Rhizobium tiansahnense* sp. Nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from a arid saline environment in Xinjiang, People sRepublic of China. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45: 153-159.
- Chopra, A. K.; Houston, C. W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbiol. Infect.**, 1: 1129-1137.
- Chopra, A. K.; Xu, X. J.; Ribardo, D.; Gonzalez, M.; Kuhl, K.; Peterson, J. W. (2000). The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. **Infect. Immunity**, 68: 2808-2818.
- Colwell, R. R. and Macdonell, M. T. (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 36: 473-477.
- Colwell, R. R. (1986). *Vibrio cholerae* and related vibrios in the aquatic environment - an ecological paradigm. **J. Appl. Bacteriol.** 61.
- Craig, S. A. S. (2004). Betaine in human nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.** 80: 539-549.
- Csonka, L. N. (1981). Proline overproduction results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. **Mol. Gen. Genet.** 182: 82-86.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiol. Rev.** 53: 121-147.
- Csonka, L. N.; Epstein, W. (1996). Osmoregulation. In: Neidhard FC et al. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. **ASM Press**, Washington, DC, pp 1210–1223.
- Csonka, L. N.; Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annu Rev. Microbiol.** 45: 569-606.
- Culham, D. E.; Lu, A.; Jishage, M.; Krogfelt, K. A.; Ishihama, A.; and Wood, J. M. (2001). The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. **Microbiol.** 147: 1657–1670.
- Dassa, E. (2000). **ABC transport**. In: Leddenberg, J. Encyclopedia of Microbiology. v 1, p. 1-12.
- Dassa, E.; Bouige, P. (2001). The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Res. Microbiol.** 152: 211-229.
- Delamare, A. P. L.; Dalcin T.; Müller G.; Costa S. O. P.; Echeverrigaray S. (2003). The effect of organic osmoprotectors on *Aeromonas trota* and *A. hydrophila* grown under high sodium chloride concentrations **Braz. J. Microbiol.** 34:128-130.

- Delamare, A. P.; Lucena, R. F.; Thomazi, G.; Ferrarini, S.; Zacaria, J.; Echeverrigaray S. (2012). *Aeromonas* detection and characterization using genus-specific PCR and single-strand conformation polymorphism (SSCP). **W. J. Microbiol. Biotech.** 28: 3007-3013.
- Delamare, A. P.; Costa, S. O.; Da Silveira, M. M.; Echeverrigaray, S. (1999). Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Lett. App. Microbiol.** 30: 57-60.
- Dunlap, V. J.; Csonka, L. N. (1965). Osmotic regulation of L-proline transport in *Satmonetta typhimurtum*. **J. Bacteriol** 163: 296-304.
- Echeverria, P.; Harrison, B. A.; Tirapat, C.; McFarland, A. (1983). Flies a source of enteric pathogens in a rural village Thailand. **J. Clin. Microbiol.** 46: 32-36.
- Elsheikh, E. A. E. (1998). Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. **Annals App. Biol.** Lannham, 132: 507-524.
- Euzéby, J. P. (2003). Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire: *Aeromonas hydrophila*. Disponível (online) <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html> (16 de setembro).
- Faatz, E.; Middendorf, A.; Bremer, E. (1988). Cloned structural genes for the osmotically regulated binding-protein-dependent glycine betaine transport system (ProU) of *Escherichia coli* K-12. **Molec. Microbiol.** 2: 265-279.
- Figueras, M. J.; Soler, L.; Chacon, M. R.; Guarro, J.; Martínez-Murcia A. J. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 2069-2073.
- Franco, B.; D. G. M.; Landgraf, M. (2005). **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p.
- Frioni, L.; Rodriguez, M.; Meerhoff, M. (2001). Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. **App. S. Ecol.** Amsterdam, 16: 275-282.
- Galindo, C. L.; Sha J.; Fadl, A. A.; Pillai, L. L.; Chopra, A. K. (2006). Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Curr. Immunol. Rev.** 2: 13-26.
- Galinski, E. A.; Trüper, H. G. (1994). Microbial behaviour in saltstressed ecosystems. **FEMS Microbiol Rev** 15: 95–108.
- Garcia-López, M. L.; Santos, J. A.; Otero A. M. (2004). *Aeromonas* spp. Food Info Online Features, United King: IFIS Publishin. Disponível (online): <http://WWW.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/13366> (25 de setembro).
- Garrit, G. M.; Winters, M.; Searles, D. B. (2001). Taxonomic outline of the prokaryotic genera Bergey's manual of systematic bacteriology. Bergey's manual' trust. 2ⁿ ed.

- Version. 4.01. New York: Springer-Verlag; Disponível (online) <http://www.cme.msu/bergeys/april/2001-genus.pdf> (09 de novembro).
- Gavriel, A. A.; Landre, J. P. B.; Lamb, A. J. (1998). Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. **J. App. Microbiol.** 84: 383-392.
- Ghatak, S.; Agarwal, R. K.; Bhilegaonkar, K. N. (2007). Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. **Lett. App. Microbiol.** 44: 550-554.
- Gorham, J. (1995). **Betaines in Higher Plants-Biosynthesis and Role in Stress Metabolism.** In: Amino Acids and their Derivatives in Higher Plants, Wallsgrove, R.M. (Ed.). Cambridge, pp: 171-203.
- Gowrishankar, J. (1985). Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. **J. Bacteriol** 164: 434-445.
- Graf, J. (1999). Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. **J.Clin. Microbiol.** 37: 3194-3197.
- Graham, P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian J. Microbiol.** Ottawa, 38: 474-484.
- Gram, L. (1991). Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* spp. On fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke, and chilling. **J. Food Prot.** 54: 436-442.
- Guerra, I. (2001). Prevalência de *Aeromonas* em pacientes hospitalizados com diarreia. **Dissertação de Mestrado.** Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- Gutierrez, C.; Barondess. J.; Manoil, C.; Beckwith, J. (1987). The use of transposon *JnphoA* to detect genes for cell envelope proteins subject to a common regulatory stimulus. **J. Mol. Biol.** 195: 289-297.
- Haardt, M.; Bremer, E. (1996). Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study the membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport system of *Escherichia coli*. **J. bacteriol.** 178:5370-5381.
- Harland, D. N.; Dassa, E.; Titball, R. W.; Brown, K. A.; Atkins, H. S. (2007). ATP-binding cassette systems in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **BMC Genomics.** 156: 434-442.

- Harland, D. N.; Garmory, H. S.; Brown, K. A.; Titball, R. W. (2005). An association between ATP-binding cassette systems, genome sizes and lifestyles of bacteria. **Res. Microbiol.** 156: 434-442.
- Heermann, R.; Jung, K. (2004). Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms. **Curr. Opin. Microbiol.** 7: 168-174.
- Hernould, M.; Gagne, S.; Fournier, M.; Quentin, C.; Arpin, C. (2008). Role of the AheABC Efflux Pump in *Aeromonas hydrophila* Intrinsic Multidrug Resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52:1559-1563.
- Higgins, C.F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Res. Microbiol.** 152: 205-210.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. **Ann. Rev. Cell Biol.** 8: 67-113.
- Hill, C.; Sleator, R. D. (2001). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiol. Reviews.** 26:49-71.
- Holt, J.G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriol.** 9nd ed. New York: The Williams and Wilkins.
- Hungria, M.; Chueire, L. M. O.; Raquel, G. C.; Manuel, M. (2001). Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 33: 1349-1361.
- Huss, H. H. (1997). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Roma: FAO-Departamento de Pesca, Documento Técnico de Pesca, v. 334, 174 p. Disponivel (online) <http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768S/T1768S00.htm#TOC> (25 de janeiro).
- Huss, H. H.; Ababouch, L.; Gram, L. (2003). Assessment and management of seafood safety and quality. Roma: **FAO**, 230 p. (FAO Fisheries Technical Paper 444).
- Huys, G; Kampfer, P; Altwegg, M; (1997). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47:1165 – 71.
- Ingham, S. C. (1990). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* on Cooked crayfish tails during cold storage under air, vacuum, and a modified atmosphere. **J. food Protection.** Des moines, Iowa, US: International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, 53: 665-667.

- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (ICMSF) (1996). Microorganisms in foods 5: microbiological specification of food pathogens. London: Blackie Academic e Professional. 513p.
- Isonhood, J. H.; Drake, M. (2002). *Aeromonas* species in foods. **J. Food Protection**, 65: 575-582.
- Jahn, M. P. (2004). Efeito osmotico da colina e da glicina betaina no rim de ratos diabéticos. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS , Porto Alegre.
- Janda, J. M.; Abbott, S. L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clin. Infect. Diseases**. 2: 332-344.
- Janda, J. M.; Abbott, S. L.; Khashe, S.; Kellogg, G. H.; Shimada T. (1996). Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. **J. Clin. Microbiol.** 34: 1930-1933.
- Janda, J. M.; Abbott, S. L.; Carnahan, A. M. (1995). *Aeromonas* and *Plesiomonas* In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Tenover, F. C. Yolken, R. H. **Manual of Clin. Microbiol.** 6 ed. Washington, D. C.: ASM Press 1482: 477-482.
- Janda, J. M.; Abbott, S. L. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. **Clin. Microbiol.** 23: 35-73.
- Kapfhammer, D.; Karatan, E. K; Pflughoef, J.; Watnick, P. I. (2005). Role for Glycine Betaine Transport in *Vibrio cholera* Osmoadaptation and Biofilm Formation within Microbial Communities **Appl. Environ. Microbiol.** 71.7: 3840-3847.
- Kempf, B.; Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. **Arch. Microbiol.** 170: 319–330.
- Kirov, S. M. (2001). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: Doyle MP et al. Food microbiology: fundamentals and frontiers. 2nd.ed. Washington, DC.: **ASM Press**. p.301-27.
- Kirov, S.M. (1993). The public health significance of *Aeromonas* sp. in foods. International **J. Foods Microbiol.** 20: 179-198.
- Knochel, S. (1990). Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp. Isolated from different environments. **Int. J. Food Microbiol.** 10: 235-244.
- Koide, T. (2006). Analise global da expressao genica de *Xilella Fastidiosa* submetida a estresses ambientais. **Tese de doutorado**. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP.

- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr., W. C. (2001). **Diagnóstico Molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica Ltda.
- Le Rudulier, D.; Strom, A. R.; Dandekar, A. M.; Smith, L. T.; Valentine, R. C. (1984). **Mol. biology of osmoregulation**. *Science* 224: 1064-1068.
- Li, Y.; Liu, Y.; Huang, H.; Ren, Y.; Zhang, Y.; Li, G.; Zhou, Z.; Wang, L. (2011). Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. **J. Bacteriol.** 193: 3389-90.
- Linton, K. J.; Higgins, C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Mol. Microbiol.** 28: 5-13.
- Lourenço, R. F. (2008). Caracterização dos sistemas ChrR- σ^R e CC3476- σ^T na resposta de *C. crescentus* ao estresse oxidativo e osmótico. **Tese de doutorado**. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP.
- Lucena, R. F. (2007). Isolamento e Caracterização de *Aeromonas* em carcaças suínas. **Tese de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- Macneil, S. D.; Nuccio, M. L.; Hanson, A. D. (1999). Betaine and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering or stress resistance. **Plant Physiol.** 120: 945-949.
- Martin-Carnahan, A.; Joseph, S. W. (2005). *Aeromonas*. In: Brenner, D. J. *et al.* **Bergey's Manual Syst. Bacteriol.** Nova Iorque, EUA: Springer, 2: 556-578.
- Martínez-Murcia, A. J.; Benlloch, S.; Collins, M. D. (1992). Phylogenetic Interrelationships of Members of the Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequencing: Lack of Congruence with Results DNA/DNA Hybridizations. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 42: 412-421.
- May, G.; Faatz, E.; Lucht, J. M.; Haardt, M. M.; Bremer, E. (1989). Characterization of the osmoregulated *Escherichia coli* proU promoter and identification of ProV as a membrane-associated protein. **Mol. Microbiol.** 3: 1521-1531.
- Measures, J. C. (1975). The role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. **Nature** 257: 398-400.
- Merino, S.; Rubires, X.; Knochel, S.; Thomas, J. M. (1995). Emerging Pathogens: *Aeromonas* spp. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam NL: Elsevier Science 28: 157-168.
- Miller, K. J.; Wood, J. M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. **Annu Rev. Microbiol** 50:101-136
- Milner, M. D. J.; Wood, J. M. (1987). Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in *Escherichia coli* K-12. **J. Gen. Microbiol.** 133: 1851-1860.

- Mourez M.; Hofnung J.; Dassa, E. (1997). Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. **Embo J.** 4: 2287-2293.
- Nicoláz, M. F.; Barcellos, F. G.; Hess, P. N.; Hungria, M. (2007). ABC transporters in *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae*: insights into evolution and pathogenicity. **Gen. Mol. Biology.** 30: 202-211.
- Nishikama, Y.; Ogasawara, J.; Kimura, T. (1993). Heat and acid sensitivity of motile *Aeromonas*: a comparison with other food-poisoning bacteria, **International J. Food Microbiol.** Washington, 18: 271-278.
- Nóbrega, R. S. A.; Motta, J. S.; Lacerda, A. M.; Moreira, F. M. S. (2004a). Tolerance of diazotrophic symbiotic bacteria to salinity. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, 28: 899-905.
- Nóbrega, R. S. A.; Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O.; Lima, A. S. (2004b). Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Rev. Bras. Ciên. Solo**, Viçosa, 28: 269-279.
- Nyyssölä, A.; Kerevuo, J.; Kaukinen, P.; Von Weymam, N.; Reinikainen, T. (2000). Extreme Halophiles Synthesize Betaine from Glycine by methylation. **J. Biol. Chem.** 275:22196-22201.
- Oliveira, P. F. (2009). Pesquisa de *Aeromonas* spp. em Cortes de Frango Produzidos Industrialmente. **Dissertação de mestrado.** Universidade Federal do Ceará Centro de Ciências Agrárias Departamento de Tecnologia de Alimentos Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza (CE).
- Ormen, O.; Granum, P. E.; Lassen, J.; Figueras, M. J. (2005). Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. **Acta Pathol. Microbiol. Immun. Scandinavica**, Copenhagen, 113: 203-207.
- Palumbo, S. A.; Call, J. E.; Cooke P. H.; Williams, A. C. (1995). Effect of polyphosphates and NaCl on *Aeromonas hydrophila* K144. **J. Food Safety** 15: 77-87.
- Palumbo, S. A.; Morgan, D. R.; Buchanan, R. L.; (1985). Influence of temperature, NaCl and pH on growth of *Aeromonas hydrophila*. **J. Food Science**, Chicago, US: Institute of Food Technologists, v. 50: 1417-1421.
- Palumbo, S.; Abeyta, C.; Stelma, G.; Wesley, I. W. (2001). *Aeromonas*, *Arcobacter*, and *Plesiomonas*. **Compendium of methods for the microbiological examinations of foods.** 4 ed. Washington: **American Public Health Association** –APHA, 676 30: 283-290, ISBN 087553-175-X.

- Paulsen, I. T.; Nguyen, L.; Sliwinski, M. K.; Rabus, R.; Saier, M. H. J. R. (2000). Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. **J. Mol. Biol.** 301: 75-100.
- Pierce, S. K.; Rowland-Faux, L. M.; Crombie, B. N. (1995). The Mechanism of Glycine Betaine Regulation in Response to Hyperosmotic Stress in Oyster Mitochondria: A Comparative Study of Atlantic and Chesapeake Bay Oysters. **J. Exp. Zool.** 271:161-170.
- Ponte-sucré, A. (2007). Availability and applications os ATP-binding cassette (ABC) transporters blockers. **App. Microbio. Biotech.** 76: 279-286.
- Poolman, B.; Glaasker, E.; (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. **Molec. Microbiol.** 29: 397-407.
- Popoff, M. Y.; (1984). Genus III. *Aeromonas*. In: Bergey, D. H. **Bergey's Manual of Syst. Bacteriol.** 9 ed. V. 1, Baltimore: Williams & Wilkins, 1388: 545-548.
- Rasa, S.; Jornsgard, B.; Abou-taleb, H.; Christiansen, J. L. (2001). Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. **Lett. App. Microbiol.** Oxford, 32: 379-383.
- Record, M. T. Jr.; Courtenay, E. S.; Cayley, D. S.; Guttman, H. J. (1998a). Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. **Trends Biochem Sci** 23:143–148.
- Record, M. T. Jr.; Courtenay, E. S.; Cayley, S.; Guttman, H. J. (1998b). Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. **Trends Biochem Sci** 23:190–194.
- Reith, M. E.; Singh, R. K.; Curtis, B.; Boyd, J. M.; Bouevitch, A.; Kimball, J.; Munholland, J.; Murphy, C.; Sarty, D.; Williams, A.; Nash, J. H. E.; Johnson, S. C.; Brown, L. L. (2008). The Genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. **BMC Genomics.** 9: 427
- Ress, D. C.; Johnson, E. (2009). ABC transporters: the power to change. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 10: 218-227.
- Rhodes, D.; Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 44: 357–384.
- Ribeiro, M. E. A. (2008). Caracterização de *Aeromonas* spp. Isoladas de Águas não Tratadas para Consumo Humano. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

- Robert, H.; Le Marrec, C.; Blanco, C.; Jebbar, M.; (2000). Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 509-517.
- Rodrigues, E. (2007). Pesquisa de *Aeromonas* spp. em tilápia (*Oreochromis niloticus*), cultivada no estado do Rio de Janeiro-Brasil: Isolamento, identificação de espécies e avaliação da atividade antimicrobiana. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal Fluminense, Niterói RJ.
- Saad, S. M. I; Iaria, S. T; Furlanetto, S. M. P. (1995). Motile *Aeromonas* spp. In retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.** 26: 22-27.
- Saavedra, M. J.; Figueras, M. J.; Martínez-Murcia, A. J. (2006). Update phylogeny of the genus *Aeromonas*. **Int J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2481-2487.
- Saloratto, A. L. F. (2001). Clonagem e Caracterização do Gene *atrD*, que Codifica um Transportador do Tipo ABC (ATP-Binding Cassette) Envolvido na Resistência a Múltiplas Drogas no Dermatofito *Trichophyton rubrum*. **Tese de doutorado**. Faculdade de medicina de ribeirão preto. Departamento de genética.
- Santos, J. A.; Gonzalez, C. J.; Otero, A.; Garcia-Lopez, M. L. (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. **App. & Environ. Microbiol.** 65: 5612-5614.
- Schubert, R. H. W. (1991). *Aeromonads* and their significance as potential pathogens in water. **J. Appl. Microbiol Symposium Supplement**, 70: 131S-135S.
- Schuldiner, S.; Padan, E. (1992). **Na⁺/H⁺ antiporter in *E. coli*** In: Bakker E. Alkali cation transport systems in prokaryotes. Boca Raton: CRC Press; p. 25-51.
- Serrano, R. (1994). Yeast halotolerance genes: crucial ion transport and metabolic reactions in salt tolerance. In: Cher. J. H. Bioch. Cell. mechanism of stress tolerance in plants. **Cell Biol.** Berlin: Springer-Verlag; p. 371-380.
- Seshadri, R.; Joseph, S. W.; Chopra, A. K.; Sha, J.; Shaw, J.; Graf, J.; Haft, D.; Wu, M.; Ren, Q.; Rosovitz, M. J.; Madupu, R.; Tallon, L.; Kim, M.; Jin, S.; Vuong, H.; Stine, O. C.; Ali, A.; Horneman, A. J.; Heidelberg, J. F. (2006). Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of All Trades. **J. Bacteriol.** 188: 8272-8282.
- Shereen, A.; Ansari, R.; Naqvi, S. S. M.; Soomro, A. Q. (1998). Effect of salinity on *Rhizobium* sp., nodulation and growth of soybean (*Glycine max.* L.). **Pakistan J. Botany**, Pakistan, 30: 75- 81..

- Sleator, R. D.; Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiol. Rev.** 26: 49-71.
- Szczuka, E; Kaznowski, A. (2004). Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. Strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 220-228.
- Tamimi, S. M. (2001). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the soils of the Jordan Valley. **App. Soil Ecology**, Amsterdam, 19: 183-190.
- Tanabe, M.; Atkins, H. S.; Harland, D. N.; Elvin, S. J.; Stagg, A. J.; Mirza, O.; Titball, R. W.; Byrne, B.; Brown K. A. (2006). The ABC Transporter Protein OppA Provides Protection against Experimental *Yersinia pestis* Infection. **Infect. immunity**, 74: 3687-3691.
- Teixeira, M. (2007). Anátomo-Clinica e Biologia em Frangos de Corte experimentalmente Infectados com *Eimeria acervulina* e Suplementados com Betaína. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. Seropédica, RJ.
- Tena, D.; González-Praetorius, A.; Gimeno, C.; Pérez-Pomata M. T.; Bisquert, J. (2007). Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp. : revisión de 38 casos. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** 25: 235-241.
- Tequianes-Bravo, L.; Pérez-González, D. A.; González-Malvárez, M. M.; Flores-Pimentel, M.; Marroquín-Segura, R. (2005). Aislamiento de *Aeromonas* Productoras de Aerolisina y Enterotoxina, em Amuestras de Água Potable em la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y Otras Dependências de la Universidad Nacional Autónoma de México. **Bioquímica** (México). 30: 23-29.
- Trakhna, F.; Harf-Monteil C.; Abdelnour A.; Maaroufi A.; Gadonna-Widehem, P. (2009). Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method. **Lett. App. Microbial.** 49: 186-190.
- Tsai, Y. H.; Huang, K. C.; Huang, T. J.; Hsu, R. W. (2009). Fatal Necrotizing Fasciitis Caused by *Aeromonas sobria* in Two Diabetic Patients. **Clin. Orthopaedics and Related Res.** v.467, 846–849.
- Uehara, F. I. (2008). Concordância entre perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, São Paulo SP.

- Van Der Heide, T.; Poolman, B. (2000). Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. **PNAS**. 97: 7102-7106.
- Varnam, A. H.; Evans, M. G. (1996). *Aeromonas*. In. Foodborne pathogens: an illustrated text. London: **Manson Publishing**, 557 p. cap.9, p. 185-199.
- Varnan, A. H.; Evans, M. G. (1991). **Foodborne pathogens: an illustrated text**. St. Louis: Mosby Year Book. 565p.
- Vieira, R. H. S. F. (2003). **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 380p.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Gallardo, F.; Vargas, M.; Soler, L.; Figueras, M. J.; Gascon, J. (2003). *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerg. Infect. Dis.** 9: 552-555.
- Vivekanandhan, G.; Savithamani, K.; Lakshmanaperumalsamy, P. (2003). Influence of pH, salt concentration and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **J. Environ. Biology** 24: 373-379.
- Vizzotto, B. S. (2009). Caracterização Fenotípica e Molecular de Estirpes de *Aeromonas* Isoladas no Paraná no período de 1999-2009. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR).
- Whitaker, B. W.; Parent, M. A.; Naughton, L. M.; Richardes, G. P.; Blumerman, S. L.; Boyd, E. F. (2010). Modulation of Responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and Temperature Stresses by Growth at Different Salt Concentrations. **Appl. Environ. Microbiol.** 76: 4720-4729.
- White, D. (2000). **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. New York: Oxford Univ. Press.
- Yancey, P. H. (1994). Compatible and counteracting solutes. IN: Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume regulation (K. Strange ed.) CRC Press, Boca Raton, 81-109.
- Yancey, P. H.; Clark, M. E.; Hand, S. C.; Bowlus, R. D.; Somero, G. N. (1982), Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, 217, 1214-1222.
- Young J.; Holland, I. B. (1999). ABC transporters bacterial exporters- revisited five years on. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1461 p. 177-200.
- Zucolotto, T.; Delamare, A. P. L.; Costa, S. O. P.; Echeverrigaray, S. (2006). *Aeromonas* Growth Under Low temperatures. In: Mendez-Vilas, A. (Org.) **Mod. Mult. App.**

Microbiol. Exploiting Microbes and Their Interactions. Weinheim: Wiley –VCH. P. 276-280.