

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Nutrição**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



Dissertação de Mestrado

**Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes***

**Taiciane Gonçalves da Silva**

Pelotas, 2021

**Taiciane Gonçalves da Silva**

**Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Pieniz

Co-orientador: Prof. Dr. Augusto Schneider

Co-orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S586e Silva, Taiciane Gonçalves da

Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes* / Taiciane Gonçalves da Silva ; Simone Pieniz, orientadora ; Augusto Schneider, Wladimir Padilha da Silva, coorientadores. — Pelotas, 2021.  
43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Comunicação celular. 2. Bactérias ácido lácticas. 3. Mono-cultura. 4. Co-cultura. 5. Patogenicidade. I. Pieniz, Simone, orient. II. Schneider, Augusto, coorient. III. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figas Machado CRB: 10/1612

Taiciane Gonçalves da Silva

Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes*

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 09/03/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Simone Pieniz (Orientadora)  
Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra  
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Dra. Isabela Schneid Kroning  
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr Robson Andrezza (Suplente)  
Doutor em Ciência do solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## **Agradecimentos**

A minha família pelo apoio prestado ao longo desta jornada, em especial ao meu irmão Rodrigo o qual sempre esteve presente de forma ativa em todos os momentos. As amigas Amanda, Gabrielle, Thayane e Jessica que estiveram ao meu lado mesmo quando longe fisicamente.

Agradeço ainda minhas colegas de laboratório que sempre estiveram a toda disposição para me auxiliar além dos momentos de alegria que passamos. E sinceramente, sem vocês seria impossível a realização de qualquer trabalho Greice, Joseane e Paola.

A Professora Simone Pieniz pela oportunidade dada desde 2016, aos ensinamentos e por ter confiado na minha capacidade. Agradeço ainda, ao programa de Pós-graduação em nutrição e alimentos da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

## Resumo

Silva, Taiciane Gonçalves. **Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes***. 2021. nº 41. Dissertação. (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

*Listeria monocytogenes* é um micro-organismo patogênico o qual causa uma doença chamada listeriose que ocorre com a ingestão de alimentos contaminados. Para o controle da contaminação por este micro-organismo há evidências de que crescimento em co-cultura com bactérias ácido lácticas possa afetar seu crescimento. O mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre é o *quorum sensing*, processo este de sinalização entre as células bacterianas o qual permite ocorrer um controle coletivo de expressão gênica sendo realizado por produção, secreção e detecção de auto-indutores como AI-2 sintetizado pela enzima luxS. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar a ação inibitória do *L. lactis* subsp. *lactis* (R7) sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 e o isolado *L. monocytogenes* L9 por meio do processo *quorum sensing*. Para isso, o estudo avaliou a multiplicação em mono-cultura e co-cultura, transcrição do gene *luxS* e investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediada pelo gene *luxS* por *quorum sensing* em *L. lactis* subsp. *lactis* (R7). Por meio dos resultados, foi possível observar redução da multiplicação das duas cepas de *L. monocytogenes* quando em co-cultura com *L. Lactis* R7 e, ainda, as alterações de pH coincidentes com a redução de crescimento de ambas as cepas de *L. monocytogenes*, o que sugere um possível mecanismo de inibição que *L. lactis* R7 exerce na multiplicação do patógeno.

**Palavras-chave:** Comunicação celular. Bactérias ácido lácticas. Mono-cultura. Co-cultura. Patogenicidade.

## Abstract

*Listeria monocytogenes* a pathogenic microorganism which causes a disease called listeriosis that occurs with their ingestion of contaminated food. For the control of contamination by this microorganism there is evidence that growth in co-culture with lactic acid bacteria may affect its growth. The mechanism by which this phenomenon occurs is the *quorum sensing*, a signaling process between the bacterial cells which allows collective control of gene expression to occur, being carried out by production, secretion and detection of auto-inducers. Thus, the present study aims to investigate the inhibitory action of *L. Lactis* subsp. *lactis* (R7) on *L. monocytogenes* ATCC 7644 and from isolate *L. monocytogenes* L9 by means of the quorum sensing process. For this, the study evaluated the multiplication in mono-culture and co-culture, transcription of the *luxS* gene and investigation of the effect of *L. monocytogenes* mediated by the *luxS* gene by *quorum sensing* in *L. lactis* subsp. *lactis* (R7). With that, it was possible to observe the reduction of the multiplication curve of the two strains of *L. monocytogenes* when in co-culture with *L. Lactis* R7 and also the pH changes coinciding with the reduction of the curves of both *L. monocytogenes*, which suggests the use of some mechanism of inhibition of *L. lactis* R7 in the multiplication of the pathogen.

**Keywords:** Cellular communication. Lactic acid bacteria. Mono-culture. Co-culture. Pathogenicity.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Curvas de crescimento de bacteriano. (A) *L. lactis*R7 mono-cultura VS *L. lactis*R7 co-cultura 1; (B) *L. lactis*R7 mono-cultura VS *L. lactis*R7 co-cultura 2; (C) *L. monocytogenes*L9 mono-cultura VS *L. monocytogenes*L9 co-cultura 1 e (D) *L. monocytogenes*ATCC 7644 mono-cultura VS *L. monocytogenes*ATCC 7644 co-cultura 2 29
- Figura 2.** Curva de crescimento bacteriano e variação de pH. (A) Curva de crescimento de *L. monocytogenes* L9 em mono-cultura e *L. monocytogenes*L9 em co-cultura com *L. lactis*R7 e a variação de pH da co-cultura. (B) Curva de crescimento de *L. monocytogenes*ATCC 7644 em mono-cultura e *L. monocytogenes*ATCC 7644 em co-cultura com *L. lactis*R7 e a variação de pH da co-cultura 30



## Listas de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	24
<b>Tabela 2.</b>	Protocolos de tempo e de temperatura utilizados na identificação genotipagem.....	27
<b>Tabela 3.</b>	Fase de latência ( $\lambda$ ), taxa de crescimento máximo ( $\mu_{max}$ ), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h) de <i>L. lactis</i> R7, <i>L. monocytogenes</i> L9 e + <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.....	28

## Sumário

1. Introdução.....	11
2. Hipótese.....	12
3. Objetivos.....	12
1.1 Objetivo geral .....	12
4. Objetivos específicos.....	12
5. Revisão bibliográfica.....	12
5.1 <i>Lactococcus lactis</i> .....	12
5.2 <i>Listeria monocytogenes</i> x patogenicidade.....	14
5.3 <i>Quorum sensing</i> .....	17
5.4 <i>Quorum sensing</i> e sua relevância na microbiologia de alimentos.....	19
6. Materiais e métodos.....	20
6.1 Micro-organismos.....	20
6.2 Multiplicação em mono-cultura e co- cultura.....	21
6.3 Investigação do efeito de <i>L. monocytogenes</i> mediada pelo gene <i>luxS</i> por <i>quorum sensing</i> em <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> (R7).....	22
6.4 PCR em tempo real para a investigação do <i>quorum sensing</i> .....	22
6.5 Genotipagem.....	26
6.6 Análise estatística.....	27
7. Resultados.....	28
8. Discussão.....	31
9. Conclusão.....	33
Referências.....	33
Adendo.....	41

## 1. Introdução

*Listeria monocytogenes* é considerado um micro-organismo patogênico, causador de listeriose, uma doença grave, a qual pode ocasionar quadro de septicemia, gastroenterites, meningite e encefalite que podem levar ao óbito, principalmente, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (LOMONACO et al., 2015). Este micro-organismo é caracterizado como um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado, pode multiplicar-se entre as temperaturas de 1°C e 45°C, resistir ao pH entre 4,3 e 9,6 e concentração de sal (NaCl) de 10% (LOMONACO et al., 2015). Para que ocorra o controle de contaminação alguns estudos vêm evidenciando que a co-cultura deste patógeno com bactérias ácido lácticas (BAL) podem interferir na sua multiplicação (JENABIAN et al., 2011; FERRAZ, 2019).

BAL são constituídas em um grande grupo de bactérias benéficas à saúde que tem como produto final da fermentação o ácido lático (MOKOENA, 2017). Estas bactérias quando em convívio com bactérias patogênicas dispõem de mecanismos como competição de nutrientes, competição por sítios de adesão nas células epiteliais, estímulo à resposta imune do hospedeiro, produção de bacteriocinas e inibição de genes de virulência ou de expressão de proteínas (OELSCHLAEGGER, 2010; MOKOENA, 2017). Um dos mecanismos para o controle da multiplicação e inibição de genes de virulência é o *quorum sensing* (QS) (MAN et al., 2014; ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017). Este é um processo de sinalização entre as células bacterianas o qual permite ocorrer um controle coletivo de expressão gênica quando há uma alta densidade populacional, sendo realizado por produção, secreção e detecção de autoindutores (AI) que são pequenas moléculas sinalizadoras (ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017). Existem alguns grupos de AI sendo um deles o AI-2, o qual é formado via enzima LuxS (COUTO, 2018).

Um estudo realizado por Jia e colaboradores (2017), apresentaram relação do mecanismo de *quorum sensing* mediado pelo gene *luxS*. Além deste, outro estudo realizado Jenabian (2011) evidenciou que quando em co-cultura, *Lactobacillus acidophilus* reduziu a multiplicação da *L. monocytogenes* e que o nível de transcrição do gene *luxS* aumentou significativamente quando o *L. acidophilus* foi exposto a células viáveis de *L. monocytogenes*.

Desta forma, o presente estudo visa avaliar a influência do *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (R7) (*L. lactis* R7) na inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* mediada pelo gene *luxS*.

## 2. Hipótese

*L. lactis* R7 inibe a multiplicação de *L. monocytogenes* quando em co-cultura, por meio da enzima LuxS envolvida vias como o *quorum sensing*.

## 3. Objetivo geral

Investigar a ação inibitória de *L. Lactis* R7 na multiplicação de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de um isolado de *L. monocytogenes* em queijo minas artesanal (L9) em mono e co-cultura, por meio do processo da enzima LuxS envolvida vias como o *quorum sensing*.

## 4. Objetivos específicos

4.1 Avaliar a multiplicação bacteriana em mono e co-cultura em *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9;

4.2 Avaliar do pH de mono e co-cultura em *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9;

4.3 Avaliar o efeito de *L. monocytogenes* na transcrição do gene *luxS* em *L. lactis* R7.

## 5. Revisão bibliográfica

### 5.1 *Lactococcus lactis*

Bactérias ácido lácticas (BAL) são um grande grupo de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, tolerantes a pH ácido, que apresentam como principal produto da fermentação da glicose o ácido láctico. São capazes de produção de ácidos orgânicos, como acetato, citrato, formato, lactato e succinato, capazes de reduzir o pH do meio (GÄNZLE, 2015.; MOKOENA, 2017). São homofermentativa aquelas que apresentam a capacidade de produzir apenas um substrato e heterofermentativas aquelas que na fermentação além de produzir ácido orgânico libera também etanol e CO<sub>2</sub>(MADIGAN *et al.*, 2015;MOKOENA, 2017).

Além disso, apresentam capacidade de produção de bacteriocinas as quais irão apresentar capacidade antagonista frente a micro-organismos patogênicos como a *L.monocytogenes* (WANG *et al.*, 2018).

Esse grupo é formado pelos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Dolosigranulum*, *Oenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*(ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2013; MOKOENA, 2017).

O gênero *Lactococcus* é caracterizado como cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados e sem motilidade. Catalase negativa, oxidase negativa, com ótima temperatura para multiplicação a 30°C, não ocorrendo em pH 9,6 ou em 6,5% de NaCl. Este gênero de BAL apresenta algumas espécies, sendo a principal delas a espécie *lactis*, a qual é dividida em subespécies, dentre estas as principais *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, além de serem caracterizados como homolactato (PARAPOULI *et al.*, 2013; MOKOENA, 2017; SONG *et al.*, 2017).

*L. lactis* subsp. *lactis* apresenta potencial benéfico à saúde humana devido a sua capacidade probiótica, tanto individualmente quanto em conjunto com outros micro-organismos probióticos (SONG *et al.*, 2017). Além disso, é utilizada pela indústria de alimentos na produção de queijos macios, pois atua modificando as características sensoriais como aroma, cor e sabor devido sua acidificação, além de atuar como bioconservador por meio da produção de ácido láctico, acético e propiônico; antimicrobianos como as bacteriocinas, peróxidos de hidrogênio e diacetil (SONG *et al.*, 2017; KHEMARIYA *et al.*, 2017).

A nisina, principal bacteriocina produzida *L. lactis*, vem sendo utilizada como conservante natural de alimentos como requeijão, queijo fundido, queijos pasteurizados e queijo em ralado, pois apresenta atividade antimicrobiana contra patógenos como *L. monocytogenes* (SUGANTHI *et al.*, 2012,SONG *et al.*, 2017). Cada metabolito excretado por *L. lactis* irá exercer ação antagônica a outros micro-organismos, como a interferência dos ácidos orgânicos no funcionamento de reações metabólicas, sendo considerado assim, um obstáculo na multiplicação e na proliferação de micro-organismos, principalmente os patogênicos (SUSKOVIC *et al.*, 2010;KHEMARIYA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018).

## 5.2 *Listeria monocytogenes* x patogenicidade

*L. monocytogenes* caracterizado como um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado, possuindo flagelos peritríquios o que confere motilidade característica, quando incubado entre as temperaturas de 20°C e 25°C. Esse pode multiplicar-se entre as temperaturas de 1°C e 45°C, resistir ao pH entre 4,3 e 9,6 e a concentração de sal (NaCl) de 10% (LOMONACO *et al.*, 2015). A doença causada por este micro-organismo denomina-se listeriose, uma doença grave a qual pode ocasionar quadro de septicemia, gastroenterites, meningite e encefalite que podem levar ao óbito principalmente crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (LOMONACO *et al.*, 2015; WAGNER *et al.*, 2008). No Brasil, esta não apresenta registros de notificação fidedignos sendo então subdiagnosticada e subnotificada subnotificada (BRASIL, 2013).

Essa bactéria tem sido encontrada em alimentos como leite e produtos lácteos não pasteurizados, carnes contaminadas, alimentos processados como queijos, manteigas e sorvetes contaminados (BENETTI *et al.*, 2013; MONTERO *et al.*, 2015). As cepas de *L. monocytogenes* podem ser classificadas em 13 sorotipos (1 / 2a, 1 / 2b, 1 / 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7); no entanto, Nos casos de listeriose humana os sorotipos apenas 1 / 2a, 1 / 2b, 1/2c e 4b são os causadores (CARTWRIGHT *et al.*, 2013).

A infecção por *L. monocytogenes* ocorre com a ingestão de alimentos contaminados e que após a chegada ao intestino, as células bacterianas ultrapassam a barreira intestinal e são disseminadas pela linfa até chegar a seus órgãos alvo, fígado e baço (RADOSHEVICH e COSSART 2017). Estas irão entrar nas células epiteliais por endocitose, mediada pelas internalinas (Inl), e em células fagocitárias, pelo processo de fagocitose, permanecendo dentro da célula em vacúolos (fagossomos) (PIZARRO *et al.*, 2012). Em seguida ocorrerá o rompimento dos fagossomos, o qual ocorre pela quebra destes por meio das listeriolisinas e fosfolipases (COELHO *et al.*, 2018). No citoplasma estes micro-organismos irão se multiplicar e realizar a polimerização de filamentos de actina os quais irão permitir a sua proliferação extracelular (RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Este processo descrito anteriormente ocorre devido aos fatores e virulência da *L. monocytogenes*, sendo alguns destes as internalinas A (InlA) e

B (InIB), a listeriolisina O (LLO), as fosfolipases A (PlcA) e B (PlcB), proteína indutora da síntese de actina, entre outros fatores (RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Em células não fagocitárias este micro-organismo terá sua invasão por meio das internalinas, principalmente pelas InIA e InIB as quais se ligam aos receptores de membrana chamados E-caderina, devido ao seu domínio N-terminal com muitas repetições de leucina (leu) e metionina (met) (COSSART E HELENIUS, 2014). A InIA atua realizando uma ancoragem na parede celular mediada pelo seu peptídeo sinalizador no terminal N (LRR); este por sua vez, se liga ao domínio EC1 da porção extracelular da E-caderina, sendo este processo importante para que ocorra a internalização deste micro-organismo (DELLAFIORA *et al.*, 2020). A InIB é uma proteína que ativa o receptor C-met assim promovendo a endocitose. Outras internalinas como InIC também atua no processo de invasão afetando a rigidez do citoesqueleto e sinalização imune inata (RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Após esta internalização ocorre a utilização da LLO e das PlcA e PlcB na ruptura do fagossomo, assim como outras pequenas moléculas mediadoras deste processo as quais são secretadas para que haja uma resposta conjunta das bactérias. Uma destas moléculas é o feromônio peptídeo A (PplA) o qual é codificado pela PlcA, e que, em células não fagocíticas, quando secretado, promove a fuga vacuolar sem afetar diretamente a perfuração do fagossomos, sinalizando e levando a secreção de substratos dependentes do sistema de secreção SecA2 da subunidade da translocase de proteínas. Estudos apontam que estes peptídeos podem auxiliar a *L. monocytogenes* na percepção de sua presença nos fagossomos e estimular a expressão das fosfolipases PlcA e PlcB. A secreção de PplA leva a uma cascata de sinalização que aumenta a dissolução da membrana vacuolar (VERA *et al.*, 2013; XAYARATH *et al.*, 2015; RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Após a fuga do fagossomo esta bactéria irá se multiplicar no citosol com o auxílio de Hpt o qual é um transportador de fosfato de hexose, e poderá causar alterações das funções na célula hospedeira, por meio da LLO ocorrendo alterações mitocondriais, no retículo endoplasmático e nos lisossomos (RADOSHEVICH e COSSART, 2017). Além destas alterações em organelas, ainda podem haver alterações transcricionais e epigenéticas da

célula hospedeira mediadas por nucleomodulinas, as quais são secretadas no citoplasma e irão atuar no núcleo da célula alterando a ativação da imunidade celular inata. Ainda, causará alterações nas histonas inibindo ou dificultando o acesso de fatores transcricionais a regiões do DNA (ESKANDARIAN *et al.*, 2013; RADOSHEVICH e DUSSURGET, 2016).

Este micro-organismo apresenta capacidade de polimerizar filamentos de actina os quais facilitam que este se movimente de célula a célula, isto se deve a proteína indutora de montagem de actina (ActA) a qual interage com o complexo ARP2/3 para que este processo, assim como as forminas induzem a nucleação de actina (TRUONG *et al.*, 2014).

*Listeria monocytogenes* apresenta diversos genes relacionados à sua virulência sendo o *prfA*, o principal gene regulador da ilha 1 de patogenicidade de *L. monocytogenes* (LIPI-1). Nesta estão contidos os genes *hly*, *plcA*, *plcB*, *actA* e *mpl*, expressando respectivamente, LLO, PlcA, PlcB, ActA e metaloproteinase de zinco (*mpl*). Além destes, o gene *prfA* ainda regula a expressão de *inlA*, *inlB*, *inlC* e *hpt* que encontram-se fora da LIPI-1 (VERA *et al.*, 2013; RADOSHEVICH e COSSART, 2017; JOHANSSON e FREITAG, 2019). PrfA é um fator de transcrição da proteína receptora cAMP (Crp) que é ativado alostericamente quando ocorre ligação do cofator após a entrada da bactéria na célula hospedeira, regulando seus genes alvos por meio de um sítio de ligação de DNA palindrômico de 14 pb (XAYARATH *et al.*, 2015; JOHANSSON e FREITAG, 2019).

A expressão do gene *prfA* é regulada por dois promotores, *prfAP1* e *prfAP2*, localizados antes do códon de iniciação da região transcricional de *prfA* (JOHANSSON e FREITAG, 2019). Além da regulação por *prfA* a virulência também é regulada pelo sistema de expressão de 17 genes, sendo estes dois componentes o *virR* e *virS* (KANG *et al.*, 2015). Um destes genes é o *dltA* o qual está envolvido na D-alanilação dos ácidos lipoteicoicos, assim como o gene *mprF* o qual modifica fosfolipídeos (VERA *et al.*, 2013).

Pequenos RNAs não codificantes podem auxiliar na expressão gênica. O Rli27 é um pequeno RNA, está envolvido na regulação da expressão da proteína Lmo0514, sendo uma importante proteína para virulência. ORli27 se liga e altera a estrutura do transcrito que libera um local de ligação para o



ribossomo fazendo com que ocorra um aumento na tradução de proteínas (QUEREDA et al., 2014; JOHANSSON e FREITAG, 2019).

### **5.3 Quorum sensing**

O *quorum sensing* (QS) pode ser definido como um processo de comunicação entre as bactérias, no qual haverá modificação de comportamento coletivo em resposta a mudanças na densidade celular, sendo este mediado por moléculas sinalizadoras liberados pela membrana celular e que será responsável pela regulação da expressão de alguns genes em resposta a presença de outras bactérias (SOLA et al., 2012; ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017).

Inicialmente ocorre a síntese destas moléculas sinalizadoras intracelularmente e são liberadas por difusão ou secretadas para o meio extracelular. Quando ocorre redução da densidade celular a concentração destas moléculas estará em baixo nível e não será detectada, porém quando houver aumento na densidade celular a concentração destas moléculas estará aumentada a um nível de detecção. Neste momento ocorrerá a ligação destas moléculas a seus receptores de membrana ou citoplasmáticos, modulando desta forma cascatas de sinalização, resultando em alterações na transcrição e na expressão de genes na população (COUTO, 2018; TAN et al., 2017).

O sistema QS apresenta diferença entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas geralmente utilizam peptídeos e sistemas de dois componentes sendo estes receptores quinases ligados a membrana e fatores de transcrição citoplasmática que atuam na modulação da expressão gênica (MONNET et al., 2016). Já as Gram-negativas utilizam vários AI com heterogeneidade nas respostas de QS (PAPENFORT e BASSLER, 2016).

Os Ais mais estudados são os oligopeptídeos, AI-1 AI-2 e AI-3 utilizados por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SOLA et al., 2012; COUTO, 2018). AI-1 é específico de bactérias Gram-negativas sendo sua molécula sinalizadora a N-3-oxohexanoyl-L-homoserina lactona e LuxR, ativador transcricional dos genes *lux* (PAPENFORT e BASSLER, 2016). AI-2 trata-se de um modo de sinalização interespecífica estando presente em Gram-negativas e Gram-positivas (ABISADO et al., 2018). O gene *luxS* codifica as enzimas envolvidas na via de reciclagem da S-adenosilmetionina (SAM), Pfs e Metk, que com a liberação do metil SAM gera S-adenosilhomocisteína (SAH),

convertida por Pfs em S-ribosilhomocisteína (SRH), sendo esta, substrato para a enzima LuxS. Esta catalisa a clivagem de SRH gerando homocisteína e liberando o 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD), o qual é uma molécula que cicliza diferentes isômeros quando em solução, por exemplo, os AI-2 (SOLA et al., 2012; PAPENFORT e BASSLER, 2016; COUTO, 2018). A enzima LuxS além de participar da síntese de AI-2 ainda apresenta um importante papel no metabolismo bacteriano, pois, faz parte da hidrólise da SAH em SAM, a qual é a principal via de formação de poliamina e síntese de vitaminas pelas bactérias (BONHOURE et al., 2015). Já os AI-3 são menos conhecidos e estão relacionados a regulação de fatores de virulência da EHEC e a expressão da toxina de Shiga (PAPENFORT e BASSLER, 2016).

As bactérias Gram-positivas irão se comunicar utilizando sistema de detecção. Os oligopeptídeos serão produzidos e transportados para o meio extracelular e o mecanismo de transmissão do sinal ocorrerá devido a uma cascata de fosforilação e defosforilação. Estes oligopeptídeos após atingirem uma determinada concentração serão detectados pela proteína cinasetransmembranar. A interação dos oligopeptídeos com a proteína cinase leva a uma cascata de reações que resultam na fosforilação da proteína reguladora que se ligará aos promotores dos genes alvo envolvidos no QS (LI e TIAN, 2012; ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017).

Este mecanismo permite que as bactérias possam distinguir sua espécie de outras, visto que é um sistema intra e interespecie, fornecendo assim informações importantes sobre a espécie na qual está crescendo em conjunto e, assim, permitindo a modulação de seu comportamento (GRANDCLEMENT et al., 2016; COUTO, 2018). Estudos afirmam que essa comunicação celular leva a regulação de vários genes, alterando assim, processos como bioluminescência, produção de antimicrobianos, formação de biofilmes, crescimento, esporulação, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, produção de bacteriocinas, toxinas e expressão de genes de virulência (JIA et al., 2017; LIU et al., 2017; MA et al., 2015).

#### **5.4 Quorum sensing e sua relevância**

Por ser um mecanismo envolvido em vários processos, o QS apresenta uma grande relevância a exemplo do estudo realizado por Jia e colaboradores

(2017) utilizaram o QS para investigar os mecanismos moleculares do gene *luxS* na síntese de bacteriocinas por BAL, e evidenciou que este apresenta relação com as vias metabólicas de nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídios para a produção de bacteriocinas.

No estudo de Jianpeng e colaboradores (2018) utilizou *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* em co-cultura na conservação de camarões e pode concluir que a atividade antimicrobiana de *L. plantarum* aumentou em co-cultura com *Lactobacillus casei* isto coincidiu com o aumento da transcrição do gene *luxS*, sugerindo então que QS está envolvido no processo de síntese de bacteriocinas. Neste mesmo estudo, ainda foi possível evidenciar uma diminuição do pH significativamente maior em co-cultura do que quando comparado com a mono-cultura, assim como aumento na produção de ácido láctico. Isso sugere que além da produção de bacteriocinas o QS está envolvido na produção de ácidos orgânicos por BAL.

Além deste, Liu e colaboradores (2017) evidenciaram que o QS mediado por *luxS*- AI2, está envolvido na formação de biofilmes por atuar como modulador de genes envolvidos na síntese de biofilmes como *tuf*, *fba*, *gap*, *pgm*, *nfo*, *rib* e *rpoN* em *Lactobacillus paraplantarum*, sendo alguns destes genes responsáveis pela via glicolítica. As proteínas envolvidas na via glicolítica foram indicadas como reguladas positivamente de biofilme para *L.monocytogenes*no estudo de Zhou e colaboradores (2012).

Quanto a suscetibilidade a antimicrobianos, Ma e colaboradores (2015) investigaram a relação entre o sistema *luxS*/ AI-2 e suscetibilidade a antimicrobianos de *Streptococcusagalactiae* e evidenciaram que a cepa de gene *luxS* nocaute apresentou maior suscetibilidade a cefradina e norfloxacinado que a cepa não modificada. Isto indica que QS pode estar envolvido no mecanismo de resistência a antimicrobianos. Ainda, Ma e colaboradores (2017),avaliaram a resistência a ácido, adesão celular e níveis transcricionais de genes de virulência de *S.agalactiae*, este concluiu que em cepas onde o gene *luxS* foi inativado, houve uma redução significativa destas atividades quando comparado com cepas sem alterações gênicas.

Além das ações citadas anteriormente, um estudo evidenciou que a adesão células intestinais por *Lactobacillus plantarum* foi maior em cepas

isoladas quando comparadas com cepas que tinham exclusão da expressão do gene *luxS* (JIA et al., 2018).

QS é um mecanismo de grande interesse na microbiologia de alimentos por estar envolvidos nos processos relacionados a patogenicidade e deterioração de alimentos (GALIÉ et al., 2018). Jenabian (2011) em seu estudo realizado com o mono e o co-cultivo de *Lactobacillus acidophilus* e *L. monocytogenes* com a finalidade de testar se o gene *luxS* regularia positivamente a resposta a *L. monocytogenes*, constatou que quando em co-cultura juntamente com *L. acidophilus*, *L. monocytogenes* teve seu crescimento afetado e que o nível de transcrição do gene *luxS* aumentou significativamente quando o *L. acidophilus* foi exposto a células viáveis de *L. monocytogenes*.

Estudos mais antigos já vinham evidenciando a ocorrência deste mecanismo em produtos alimentícios, como estudo realizado por Lu e colaboradores (2004) no qual utilizaram produtos *in natura* e industrializados, a fim de comparar se estes teriam níveis de AI-2 semelhantes entre os grupos. Evidenciou-se ainda que haviam moléculas de AI-2 presentes em leite pasteurizado, o que permitiu concluir que o aquecimento a 80°C não destrói essas moléculas sinalizadoras, assim como proteases responsáveis pela deterioração do leite. Além do leite, o mesmo estudo ainda encontrou AI-2 em peixe congelado, em amostras de tomate, melão, cenoura e tofu.

Este mecanismo vem sendo investigado atualmente quanto sua relação com o processo de deterioração de alimentos (GALIÉ et al., 2018). Em biofilme há uma alta concentração de células bacterianas o que leva a ocorrência deste mecanismo com a finalidade de regular a expressão gênica conjunta destas células (BORGES et al., 2016). Autoindutor-2 está envolvido em mecanismos como na formação de biofilmes e na produção de fatores de virulência, em alguns casos, a exemplo do *Clostridium perfringens*, o QS controla a produção de toxinas via LuxS / AI-2 (ONTANI e SHIMIZU, 2016). Duanis-Assaf (2015) demonstrou em seu estudo, produção de biofilme por *Bacillus subtilis* induzida por lactose, onde em resposta a essa indução foi observado o aumento na produção de AI-2.

O QS é um mecanismo ainda pouco estudado e de acordo com o elucidado até então, está envolvido em diversas atividades microbianas e se

faz necessária a realização de mais estudos para esclarecimento de algumas lacunas.

## **6. Materiais e métodos**

### **6.1 Micro-organismos**

As bactérias utilizadas no presente estudo foram provenientes da coleção em estoque conservado do Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição (FN), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sendo estas *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (R7) (*L. lactis* R7), isolado de queijo ricota convencional, o qual foi depositado no GenBank sob número de acesso KF879126, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* isolado de queijo minas artesanal (L9).

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia e Laboratório de Nutrigenômica da FN, UFPEL.

### **6.2 Multiplicação em mono-cultura e co-cultura**

#### **6.2.1 Mono-cultura**

Os micro-organismos *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9 foram inocuados duas vezes antes da utilização em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37°C *overnight*. Nos tempos(t) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas, as amostras foram coletadas para monitoramento do crescimento das colônias e aferição do pH das culturas por fitas de pH (Macherey-Nagel MN), conforme realizado por Jenabian (2011). A multiplicação foi determinada por contagem em placas em agar *Man Rogosa Sharpe*(MRS) para *L. Lactis* R7 e ágar *Oxford* para *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9. Ambas *L. monocytogenes* foram incubadas aerobicamente em placas por 48 horas a 37°C; e *L. lactis* R7 foi incubada anaerobicamente a 37°C por 48 horas.

#### **6.2.2 Co-cultura**

Cem (100)mL de caldo BHI (pH 6,5) foram pré-aquecidos (30°C) inoculado 1mL de cada cultura cultivada *overnight* foram adicionados formando co-cultura 1 (R7+L9) e co-cultura 2 (R7+ *L. monocytogenes* ATCC 7644) incubadas a 37°C por 24 horas. Nos tempos (t) = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas as amostras foram coletadas para monitoramento da multiplicação bacteriana e

alterações de pH. A multiplicação foi determinada por contagem em placas contendo agar MRS e *Oxford*.

### **6.2.3 Parâmetros de crescimento**

Taxa específica de crescimento máxima ( $\mu_{max}$ ) foi determinada como o declive da região linear entre o início da contagem microbiana versus o tempo de multiplicação (Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml ( $\Delta \ln CFU ml^{-1} / \Delta t$ ) no tempo (t) = 2–6 h para *L. lactis*R7 e no t = 0-4 h para ambas *L. monocytogenes*). A densidade populacional final (N24h) foi determinada a partir da UFC/mL no último tempo de coleta e a densidade populacional máxima (Nmax) foi determinado como a maior UFC/mL coletada da curva.

## **6.3 Genotipagem**

### **6.3.1 Extração de DNA**

A análise de extração do DNA está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

### **6.3.2 Amplificação do DNA por PCR**

A análise de amplificação do DNA por PCR está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

## **6.4 Investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediado pelo gene *luxS* por quorum sensing em *L. lactis* subsp. *Lactis* (R7)**

A análise da investigação do efeito de *L. monocytogenes* medido pelo gene *luxS* por quorum sensing em *L. lactis* subsp. *Lactis* (R70 está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

## **6.5 PCR em tempo real para a investigação do quorum sensing**

### **6.5.1 Extração do RNA**

A análise de extração do RNA está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

### **6.5.2 Análise da pureza e integridade do RNA extraído**

A análise da pureza e integridade do RNA está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

### **6.5.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

A análise da síntese do DNA complementar está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

#### **6.5.4 PCR quantitativo de transcrição reversa (qRT-PCR)**

A análise da expressão do gene *luxS* está sendo realizada. Metodologia presente no adendo.

#### **6.6 Análise estatística**

Os dados foram analisados por meio de análise de variância bidirecional (Two-way ANOVA) e teste de Tukey a um nível de significância de 5% para comparação de médias, utilizando GraphpadPrism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata e com três repetições.

## 7. Resultados

### 7.1 Multiplicação em mono-cultura e co-cultura

As culturas avaliadas foram *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC e *L. monocytogenes* L9, e co-cultura 1 (*L. lactis* R7+ *L. monocytogenes* L9) e co-cultura 2 (*L. lactis* R7+ *L. monocytogenes* ATCC). Parâmetros que descrevem a multiplicação bacteriana estão descritos na Tabela 3, onde pode-se observar uma redução do Nmax da *L. lactis*R7 em ambas as co-culturas em relação a mono-cultura(p=0,0002 e p= 0,0002). Além disso, Nmax de co-culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9 também apresentaram redução em relação a suas mono-culturas (p=0,0002 e p=0,0032). Quando avaliado o N24h observou-se redução significativa nas co-culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9 quando comparado com suas mono-culturas (p=0,0121 e p=0,0338).

Tabela 3.Fase de latência ( $\lambda$ ), taxa de crescimento máximo ( $\mu_{max}$ ), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h) de *L. lactis*R7, *L. monocytogenes*L9 e *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Micro-organismos	Cultura	$\lambda$ (h)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Nmax (Log UFC/mL <sup>-1</sup> )	N24h (Log UFC/mL <sup>-1</sup> )
R7	Mono-cultura	0,25±0,015	0,72±0,002	8,70±0,005	8,41±0,040
	Co-cultura 1	0,19±0,020	0,88±0,001	7,61±0,010*	7,56±0,010
	Co-cultura 2	0,27±0,010	0,81±0,006	7,66±0,030*	7,66±0,030
L9	Mono-cultura	0,22±0,085	0,78±0,015	7,53±0,010	7,48±0,020
	Co-cultura 1	0,15±0,045	0,88±0,000	6,90±0,140**	6,00±0,001****
ATCC	Mono-cultura	0,12±0,015	0,85±0,010	7,45±0,000	7,28±0,010
	Co-cultura 2	0,06±0,025	0,88±0,075	6,95±0,075*	6,30±0,430***

\*Dados expressos em médias e desvio padrão com valor de p=0,0002\*, p=0,0032\*\*, p=0,0121\*\*\* e p=0,0338\*\*\*\*.

A multiplicação e/ou crescimento celular está apresentada na Figura 1, onde observa-se redução de *L. Lactis*R7 tanto na co-cultura 1 quanto na co-cultura 2 em relação a sua mono-cultura, a partir do tempo de 4 horas (p<0,004 e p<0,001) até as 24 horas (p=0,020 e p<0,040), apresentando seus picos máximos em 12horas sendo 8,70 Log UFC/mL<sup>-1</sup> para a mono-cultura. Já na co-



cultura 1 *L. Lactis*R7 apresentou seu pico máximo as 8 horas sendo de 7,61 7,66 Log UFC/mL<sup>-1</sup> enquanto que a co-cultura 2 obteve se pico máximo as 24 horas sendo 7,66 Log UFC/mL<sup>-1</sup>. *Listeria monocytogenes* L9 em co-cultura apresentou redução da multiplicação em relação a sua mono-cultura, sendo observado o pico máximo em co-cultura de 6,9 Log UFC/mL<sup>-1</sup> em 4 horas (p=0,0009) e em mono-cultura o pico máximo foi de 7,50 Log UFC/mL<sup>-1</sup> em 8 horas (p=0,0003). *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 apresentou maior acentuação no declive de crescimento em co-cultura, visto que no tempo de 24 horas a mono-cultura apresentava 7,49 Log UFC/mL<sup>-1</sup> enquanto que na co-cultura foi observado 6,3 Log UFC/mL<sup>-1</sup> (p<0,001).

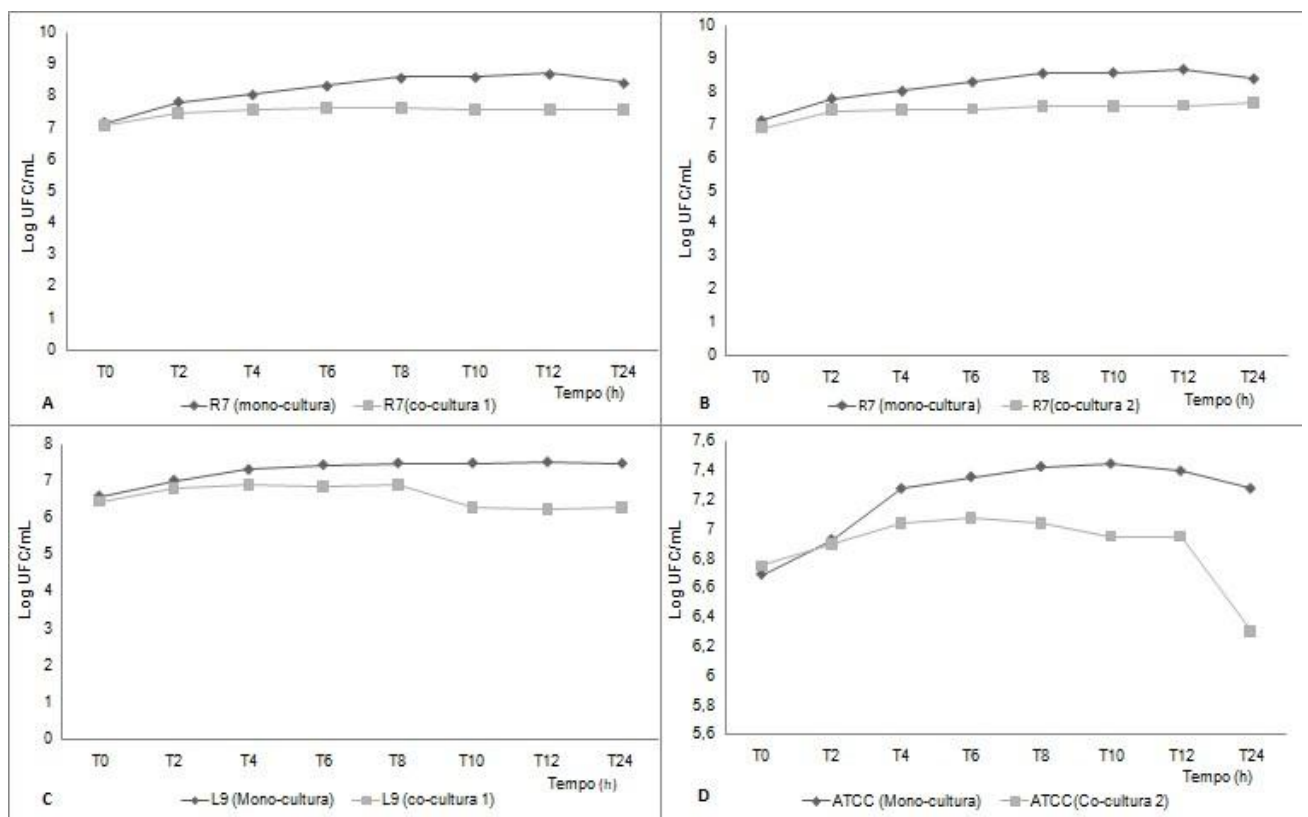
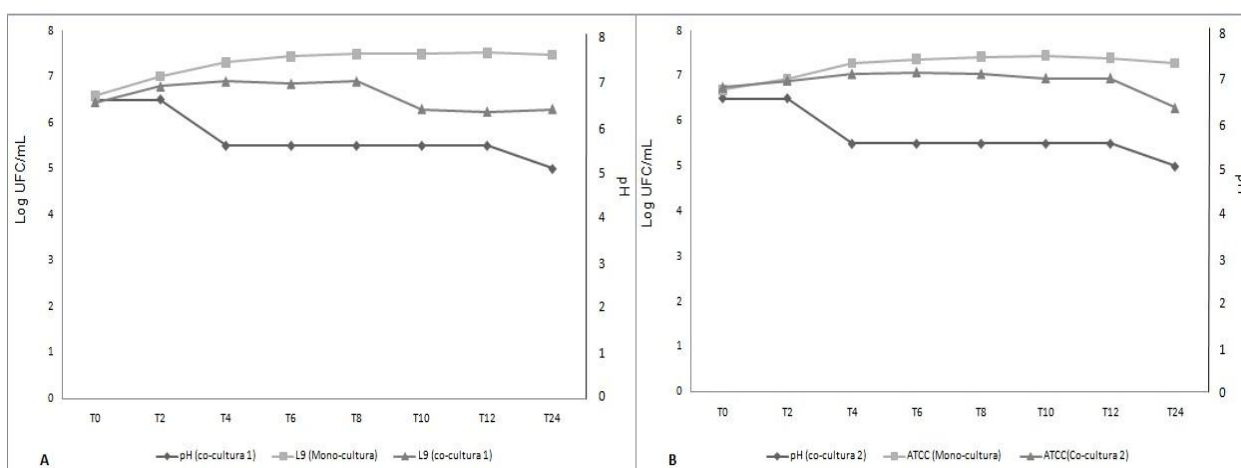


Figura 1. Curvas de crescimento de bacteriano. (A) *L. lactis* R7 mono-cultura VS *L. lactis* R7 co-cultura 1; (B) *L. lactis*R7 mono-cultura VS *L. lactis*R7 co-cultura 2; (C)*L. monocytogenes*L9 mono-cultura VS *L. monocytogenes*L9 co-cultura 1 e (D) *L. monocytogenes* ATCC 7644 mono-cultura VS *L. monocytogenes* ATCC 7644co-cultura 2.

## 7.2 Multiplicação em mono-cultura e co-cultura VS pH

Quando analisadas as curvas de crescimento e a curva de pH das co-culturas pode-se observar que *L. monocytogenes* L9 a partir do tempo de 4 horas, apresentou declínio no crescimento em relação a sua mono-cultura e, da mesma forma, foi observada diminuição do pH de 6,5 para 5,5. O mesmo pode ser observado com *L. monocytogenes* ATCC 7644 onde a partir do tempo de 6 horas observou-se declive no crescimento em relação a sua mono-cultura e foi acentuado no intervalo entre 12 horas ( $6,95 \text{ Log UFC/mL}^{-1}$ ) e 24 horas ( $6,3 \text{ Log UFC/mL}^{-1}$ ), onde o pH também reduziu de 5,5 para 5.



**Figura 2.** Curva de crescimento bacteriano e variação de pH. **(A)** Curva de crescimento de *L. monocytogenes* L9 em mono-cultura e *L. monocytogenes* L9 em co-cultura com *L. lactis* R7 e a variação de pH da co-cultura. **(B)** Curva de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em mono-cultura e *L. monocytogenes* ATCC 7644 em co-cultura com *L. lactis* R7 e a variação de pH da co-cultura.

## 7.3 Genotipagem

A análise de genotipagem está sendo desenvolvida. Dados ainda não conclusos.

## 7.4 Expressão de genes por qRT-PCR

A análise da expressão do gene *luxS* está sendo realizada. Dados não concluídos até o presente momento.

## 8. Discussão

Os parâmetros de multiplicação bacteriana apresentados no presente estudo evidenciaram uma redução significativa de todas as bactérias em co-cultura quando comparadas a suas mono-culturas. Ao analisarmos os resultados de outros estudos, *L. monocytogenes* em co-cultura com *Lactococcus piscium* apresentou redução de sua multiplicação e redução em seu  $\mu_{max}$ , embora no estudo atual este parâmetro não apresentou diferença significativa, outros parâmetros como o  $N_{max}$  e  $N_{24h}$  evidenciaram uma redução tanto nas cepas de *L. monocytogenes* como *L. lactis* R7 (SARAOUI et al., 2016). Entretanto, estudo realizado por Jenabian (2011), o qual utilizou *L. acidophilus* e *L. monocytogenes*, apresentou resultados semelhantes, porém, *L. acidophilus* não obteve redução do  $N_{max}$  como *L. lactis* R7. No presente estudo esta redução da multiplicação de *L. lactis* R7 em co-culturas pode ter ocorrido devido competição por nutrientes (CAMPAGNOLLO et al., 2018) em co-cultura desde as 4 horas onde a diferença inicial foi de  $p < 0,004$  na co-cultura 1 e  $p < 0,001$  na co-cultura 2.

Já as diferenças apresentadas pelas cepas de *L. monocytogenes* em co-cultura com as suas mono-culturas foram desde as 4 horas tanto de *L. monocytogenes* L9 quanto *L. monocytogenes* ATCC 7644. Estudo realizado por Costa (2016) co-inoculou uma cepa de *Lactococcus lactis* com *L. monocytogenes* e, assim, como no presente estudo, também evidenciou redução na multiplicação de *L. monocytogenes*. Outro estudo realizado por Garcia e colaboradores (2018), utilizando *L. monocytogenes* em co-cultura com *Lactobacillus Plantarum*, evidenciaram que depois de 6 horas apresentou uma redução de 6,39 Log UFC/mL para 4,84 Log UFC/mL.

Quando comparadas as curvas de multiplicação com o pH, *L. monocytogenes* L9 apresentou redução coincidente ao pH no tempo de 4 horas. O mesmo pode ser observado com *L. monocytogenes* ATCC 7644, que a partir do tempo de 6 horas também apresentou redução da sua multiplicação, enquanto que a *L. Lactis* R7 apresentou multiplicação celular crescente mesmo com as alterações de pH. Garcia e colaboradores (2018) realizaram estudo de

co-cultura entre duas cepas de *Lactobacillus plantarum* frente a *L. monocytogenes*, e a mesma apresentou redução do pH das co-culturas similar ao resultado encontrado no presente estudo, onde inicialmente o pH foram 6,39 e 6,38 e ao término o pH foi de 4,84 e 4,57 em cada uma das co-culturas.

As BAL apresentam capacidade de produção de ácidos orgânicos, como acetato, citrato, formato, lactato e succinato, capazes de reduzir o pH do meio. A glicose é o principal substrato que as BAL utilizam para a produção de ácido láctico, porém as homofermentativas, bactérias que apresentam apenas ácido como produto da fermentação, podem fermentar hexose e produzir ácido láctico (MADIGAN et al., 2015; GÄNZLE, 2015). Este fato, então, pode ser uma das causas da redução de pH durante o experimento.

Aryani e colaboradores (2015) quantificaram a variabilidade de cepas de *L. monocytogenes* quanto a sua multiplicação e elucidaram que todas as cepas apresentaram menor  $\mu_{max}$  em pH 4 e 5, o que reafirma o comportamento de *L. monocytogenes* com multiplicação entre pH 4 e 9 (LOMONACO et al., 2015).

Outro mecanismo pelo qual as BAL podem atuar frente a outras bactérias é por produção de bacteriocinas, as quais, alguns autores vêm evidenciando seus efeitos sobre bactérias patogênicas como a *L. monocytogenes* (WORAPRAYOTE et al., 2016; WANG et al., 2018).

Em contrapartida, estudo realizado por Saraoui e colaboradores (2016), os quais analisaram os mecanismos inibitórios de *L. piscium* contra *L. monocytogenes*, observaram inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* de 4 para 3 log UFC/g<sup>-1</sup> após 24 horas, porém, esta inibição não foi devida a produção de ácidos orgânicos ou bacteriocinas, mas provavelmente por competição por nutrientes. Além disso, essa inibição foi observada apenas quando as células estavam em contato, o que leva a hipótese de algum mecanismo molecular por contato entre as células dos dois micro-organismos.

Um mecanismo molecular que pode apresentar alterações na curva de pH é QS. Gu e colaboradores (2018) evidenciaram a expressão do gene *luxS* do *L. fermentum* principalmente com a redução de pH. Estudo realizado por Jenabian e colaboradores (2011), analisou o mecanismo de QS entre *Lactobacillus acidophilus* e *L. monocytogenes*, evidenciaram além de alterações na multiplicação e pH semelhantes ao presente estudo, já

comentadas anteriormente, expressão do gene *luxS* quando células de *Lactobacillus. acidophilus* entraram em contato com células de *L. monocytogenes*, não evidenciando aumento na expressão de *luxS* quando *Lactobacillus. acidophilus* foi exposto as células não viáveis e ao meio de cultura com metabólitos de *L. monocytogenes*.

## 9. Conclusão

Por meio dos resultados obtidos conclui-se que *L. lactis* R7 apresentou ação inibitória tanto à *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando ao isolado *L. monocytogenes* L9. Além disso, apresentou alteração de pH o que dificultou a multiplicação das cepas de *L. monocytogenes*. Por fim, baseado nos resultados encontrados neste estudo e, em estudos anteriores relatados anteriormente, esta inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* pode ter ocorrido devido a produção de ácidos sendo este um processo relacionado como mecanismos moleculares como o QS.

## Referências

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnol.** v.31, p.877–902, 2013.
- ABISADO, R.G.; BENOMAR, S.; KLAUS, J.R.; DANDEKAR, A.A.; CHANDLER, J.R. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. **MBio**, v.9, n.3, 2018.
- ARYANI, D. C.; DENBESTEN, H. M. W.; HAZELEGER, W. C.; ZWIETERING, M. H. Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.208, p.19–29, 2015.
- BENETTI, T. M.; MONTEIRO, C. L. B.; BEUX, M. R.; ABRAHÃO, W. M. Enzyme linked immunosorbent assays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: A comparison with conventional methods. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 3, p. 791-794, 2013.
- BONHOUR, N; BYRNES, A.; MOIR, R.D.; HODROJ, W.; PREITNER, F.; PRAZ, V.; MARCELIN, G.; JR, CS.; MARTINEZLOPEZ, N.; SINGH, R. Loss of the Rna polymerase III repressor Maf1 confers obesity resistance. **Genes Dev**, v. 29, n. 9, p.934–947, 2015.

BORGES, A.; ABREU, A.C.; DIAS, C.; SAAVEDRA, M.J.; BORGES, F.; SIMOES, M. New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. **Molecules**, v.21, n. 7, 2016.

Brasil, estado de São Paulo [http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/2013listeria\\_monocytogenes.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/2013listeria_monocytogenes.pdf). Acessado em: 15/12/2019

CAMPAGNOLLO, F. B.; MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; FELICIANO, M. D.; FREIRE, L.; LOPES, L. S.; SANT, A. S. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288–297, 2018.

CARTWRIGHT, E. J.; JACKSON, K. A.; JOHNSON, S. D.; GRAVES, L. M.; SILK, B. J.; MAHON, B. E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerg. Infect. Dis.** v.19, p.1–9, 2013.

CASALTA, E.; MONTEL, M.C. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p. 271–273, 2008.

COELHO, C.; BROWN, L.; MARYAM, M.; VIJ, R.; SMITH, D.F.Q.; BURNET, M.C.; KYLE, J.E.; HEYMAN, H.M.; RAMIREZ, J.; ROSALES, R.P.; LAUVAU, G.; NAKAYASU, E.S.; BRADY, N.R.; BRADY, A.H.; COPPENS, I.; CASADEVALL, A. Listeria monocytogenes virulence factors, including Listeriolysin O, are secreted in biologically active Extracellular Vesicles. **J. Biol. Chem**, v.294, n. 4, p.1202-1217, 2018.

CORR, S.C.; HILL, C.; GAHAN, C.G. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. **Advances in Food and Nutrition Research**. n.56, p.1–15, 2009.

COSSART, P.; HELENIUS, A. Endocytosis of viruses and bacteria. **Cold Spring Harbor Persp. Biol.** v.6, p.1-28, 2014.

COSTA, A.C.C.C. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e avaliação de sua atividade frente a patógenos alimentares em sistema de bioconservação de produto lácteo**. Goiânia. 2016. 68f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e

Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

COUTO, Samuel. **Influência dos sistemas de Quorumsensing AI-1/AI-2/AI-3 nos fatores de virulência de EPEC atípica de origem animal**. 2018. 151f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

DELLAFIORA, L.; FILIPELLO, V.; DALL'ASTA, C.; FINAZZI, G.; GALAVERNA, G.; LOSIO, M.N. A Structural Study on the *Listeria monocytogenes* Internalin A—Human E-cadherin Interaction: A Molecular Tool to Investigate the Effect of Missense Mutations. **Toxins (Basel)**, v. 60, p 1-11, 2020.

DUANIS-ASSAF, D.; STEINBERG, D.; CHAI, Y.; SHEMESH, M. The luxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **Front. Microbiol.**, v.6, n.1517, 2016.

ESKANDARIAN, H.A.; IMPENS, F.; NAHORI, M.A.; SOUBIGOU, G.; COPPÉE, J.; COSSART, P.; HAMON, M.A. A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. **Science** v. 341, 2013.

FERRAZ, S. **Papel da interação entre bactérias lácticas isoladas de alimentos na produção de bacteriocinas**. 2019. 65f. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em ciência de alimentos. Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GALIÉ, S.; GUTIÉRREZ, C.G.; MIGUÉLEZ, E.M.; VILLAR, C.J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n. 898, 2018.

GÄNZLE, M. G. Lactic acid metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p.106–117, 2015.

GARCÍA, J.P.; GIL, J.E.; BOTERO, S.; VALENCIA, F.E.G. Growth control of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Lactobacillus plantarum*. **Rev. Colomb. Biotecnol.** v. 20, n. 2, p. 68-77, 2018.

GOPU, V.; SHETTY, P.H. Cyanidin inhibits quorum signaling pathway of a food borne opportunistic pathogen. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, n.2, p. 968-976, 2016.

GRANDCLEMENT, C.; TANNIERES, M.; MORERA, S.; DESSAUX, Y.; FAURE, D. Quorumquenching: role in natureandapplieddevelopments. **FEMS Microbiol** v.40, n.1, p. 86–116, 2016.

GU, Y.; TIAN, J.; WU, R.; HE, Y. The response ofLuxS/AI-2 quorumsensing in *Lactobacillusfermentum*tochanges in environmentalgrowthconditions. **Springer**, 2018.

HANSEN, G.; YEUNG, V.P.; BERRY,G.; UMETSU, D.T.; DEKRUYFF, R.H. Vaccinationwithheat-killedListeria as adjuvant reverses establishedallergen-inducedairwayhyperreactivityandinflammation: role ofcd\* t cellsand IL-18. **JournalofImmunology**. v. 164, p-223-230, 2000.

JENABIAN, S.M.; VOGENSEN, F.K.; JESPERSEN, L. The quorumsensingluxS gene isinduced in *Lactobacillusacidophilus*NCFM in response to*Listeriamonocytogenes*. **InternationalJournalofFoodMicrobiology**. v.149, p.269–273, 2011.

JIANPENG, L.; XIAOYUAN, Y.; GUOCUI. S.; JING. C.; ZUNYING. L.; MINGYONG. Z. Cooperation of lactic acid bacteria regulated by the AI-2/LuxS system involve in the biopreservation of refrigerated shrimp. **Food Research International**. v. 120, p-679-687, 2018.

JOHANSSON, J.; FREITAG, N.E. RegulationofListeriamonocytogenesVirulence. **Microbiolspec**, p. 836-850, 2019.

KANG, J., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. BERGHOLZ, T. M. VirR-mediatedresistanceofListeriamonocytogenesagainstfoodantimicrobialsandcross-protectioninducedbyexposuretoorganicacidsalts. **Appl. Environ. Microbiol**. v.81, p. 4553–4562, 2015.

KHEMARIYA, P.; SINGH, S.; NATH, G.; GULATI, A.K. ProbioticLactococcuslactis: A Review. TurkishJournalofAgriculture .**Food Science and Technology**. v. 5, n.6, p.556-562, 2017.

LI, Y.H.; TIAN, X. Quorumsensingandbacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, v.12, p. 2519– 2538, 2012.

LIU, L.; WU, R.; ZHANG, J.; LI, P. Over expressionof*luxS*Promotes Stress ResistanceandBiofilmFormationof*Lactobacillusparaplantarum* L-ZS9 byRegulatingthe Expression ofMultiple Genes. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.



LIU, L.; WU, R.; ZHANG, J.; SHANG, N.; LI, P. D-Ribose Interferes with Quorum Sensing to Inhibit Biofilm Formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9. **Front. Microbiol.**, v.8, n. 1860, p.1-13, 2017.

LIVAK, K.J.; SCHMITTEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. **Elsevier Science**. V.25, p.402–408, 2001

LOMONACO, S; NUCERA, D; Filipello, V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infect Genet Evol**, v.35, p.172–83, 2015.

LU, L.; HUME, M. E.; PILLAI, S. D. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with additives. **Journal of food protection**, Ames, v. 67, n. 7, p. 1457-1462, 2004.

MA, Y.P.; KE, H.; HAO, L. LuxS/AI-2 *quorum sensing* is involved in antimicrobial susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. **Fish pathology**, v.50, n.1, p. 8-15, 2015.

MA, Y.; HAO, L.; KE, H.; LIANG, Z.; MA, J.; LIU, Z.; LI, Y. *LuxS/AI-2* in *Streptococcus agalactiae* reveals a key role in acid tolerance and virulence. **Res. Vet. Sci.**, v.115, p. 501-507, 2017.

MACHADO, I.; SILVA, L.R.; GIAOURIS, E.D.; MELO, L.F.; SIMÕES, M. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. **Food Research International**, v.127, 2020.

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Brock Biology of Microorganisms**. Francisco: Benjamin Cummings 13th Edition, 2015, 375 p.

MOKOENA, M.P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**. v. 8, n. 1255, p. 22-26, 2017

MONNET, V., JUILLARD, V., GARDAN, R. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.3, n.42, p. 339–351, 2016.

MONROY, D.M.C.; CASTRO, B.T.; FERNÁNDEZ, P.F.J.; MAYORGA, R.L. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. **Contacto S**, v. 73, p. 63-72, 2009.

MONTEIRO, L.R.L.; MESQUITA, A.J.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; CARDOSO, J.L. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from animal products in a city of Northern Brazil. **Ciência Rural**, v.43, p.1443–1448, 2013.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B.L. Quorum sensing signal – response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p. 576–588, 2016.

PARAPOULI, M.; DELBES-PAUS, C.; KAKOURI, A.; KOUKKOU, A.I.; MONTEL, M.C.; SAMELIS, J. Characterization of a wild, novel *nisin* a-producing *Lactococcus* strain with an *L. lactis* subsp. *cremoris* genotype and an *L. lactis* subsp. *lactis* phenotype, isolated from Greek raw milk. **Appl Environ Microbiol**, v.79, n34, p.76–84, 2013.

PIZARRO, J.C.; KÜHBACHER, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: a new view. **Cold Spring Harbor Pers Med**. n. 2, v.11, p 1-17, 2012.

ONTANI, K.; SHIMIZU, T. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. **Toxins**, v.8, n.207, 2016

QUEREDA, J. J., ORTEGA, A. D., PUCCIARELLI, M. G. & GARCIA-DEL PORTILLO, F. The *Listeria* small RNA Rli27 regulates a cell wall protein in eukaryotic cells by targeting a long 5' UTR variant. **PLoS Genet**. v.10, n.10, 2014.

RADOSHEVICH, L.; DUSSURGET, O. Cytosolic innate immune sensing and signal in upon infection. **Front. Microbiol**. v.7, n.313, 2016.

RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature reviews Microbiology**. V.16, p. 32–46, 2018.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular cloning: **A Laboratory Manual. Third Edition. New York**. Cold Spring Harbor Laboratory Press V1, Chapter 6, Protocol 7, 2001 com adaptações.

SAMUEL CAMPANELLI FREITAS COUTO. **Influência dos sistemas de quorum sensing AI-1/AI-2/AI-3 nos fatores de virulência de EPEC atípica de origem animal**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

SARAOUI, T.; FALL, P.A.; LEROI, F.; ANTIGNAC, J.F.; CHÉREAU, S.; PILET, M.F. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a

bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. **Food Microbiology**, v.53, p. 70-76, 2016.

SIAMANSOURI, M.; MOZAFFARI, S.; ALIKHANI, F. Bacteriocins and lactic acid bacteria. **J. Biol. Today's World**. v. 2, p. 227-234, 2013.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE C.S.N. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - **Goiânia**, v.8, N.14; 2012.

SONG, A.A.L.; IN, L.L.A.; LIM, S.H.E.; RAHIM, R.A. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microb Cell Fact**, v.16, n.55, p. 1-15, 2017

SUGANTHI, V.; SELVARAJAN, E.; SUBATHRADEVI, C.; MOHANASRINIVASAN, V. Lantibiotic nisin: Natural preservative from *Lactococcus lactis*. **Int res J Pharma**, v.3, n.1, p. 13-19, 2012.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIC, J.; PAVUNC, A.L.; HABJANIC, K.; MATOSIC, S. Antimicrobial Activity The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Fd Technol Biotechnol**, v.48, n.3, p.296-307, 2010.

TAN, KH.; HOW, KY.; TAN, JY.; YIN, W.F.; CHAN, K.G. Cloning and characterization of the autoinducers synthase gene from lipid-degrading bacterium *Cedecea neteri*. **Front microbiol**, 8 (e48053): 72, 2017.

TRUONG, D.; COPELAND, J. W.; BRUMELL, J. H. Bacterial subversion of host cytoskeletal machinery: hijacking formins and the Arp2/3 complex. **Bioessays**, v.36, p.687-696, 2014.

VERA, A.; GONZÁLEZ, G.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H. Principales factores de virulência de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Rev Chilena Infectol**, v.30, n.4, p. 407-416, 2013.

XAYARATH, B.; ALONZO, F.; FREITAG, N. E. Identification of a Peptide-Pheromone that Enhances *Listeria monocytogenes* Escape from Host Cell Vacuoles. **PLoS Pathog**. v.11, n. 3, 2015.

WANG, Y.; SHANG, N.; QIN, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; LI, P. The complete genome sequence of *Lacto-bacillus plantarum* LPL-1, a novel antibacterial probiotic producing class IIa bacteriocin. **Journal of Bio-technology**, v. 17, n.266, p. 84-88, 2018.

WEISE, G.M.; JESPERSEN, I. Transcriptional analysis of genes associated with stress and adhesion in *Lactobacillus acidophilus* NCFM during the passage through an in vitro gastrointestinal tract model. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**. v.18 p. 206-214, 2010.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWET-WIWATHANA, A. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **MESC**, n.120, p. 118–132, 2016.

YEUNG, V.P.; GIENI, R.S.; UMETSU, D.T.; DEKRUYFF, R.H. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. **Journal of immunology**. v.161, p.4146-4152, 1998.

ZIEMICHÓD A, SKOTARCZAK B. QS – systems communication of gram-positive bacterial cells. **Acta Biol**, v.24, p.51–56, 2017.

**ADENDO**

## **Adendo 1. Resultados incompletos – Pesquisa em andamento**

Devido ao cenário mundial, causado pela pandemia de coronavírus (COVID-19 - Sars-Cov-2) a qual levou a interrupção de diversas atividades, dentre estas, das Instituições de Ensino Superior, incluindo a Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), resultou na impossibilidade do trabalho presencial desde 03/2020 até o presente momento (03/2021). Neste sentido, o presente estudo foi prejudicado, e assim, parte da pesquisa de campo, como investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediado pelo gene *luxS* por *quorum sensing* em *L. lactis* subsp. *Lactis* (R7) por qRT-PCR em tempo real e genotipagem, não foram executados no período proposto, pois estes experimentos necessitavam da utilização de outros laboratórios parceiros da UFPEL, o que não foi possível devido ao número reduzido de circulação de pessoas, acúmulo de pesquisas, sobrecarga das rotinas, entre outros.

Com a aprovação da aluna no Doutorado e de acordo com a orientação da Pró-Reitoria de Pós-Graduação desta Instituição, a defesa da Dissertação será realizada, porém, a confecção do diploma de Mestre ficará condicionada ao desenvolvimento pleno das pesquisas propostas neste estudo, com subsequente elaboração e submissão de um artigo científico à Revista Científica de alto impacto. Desta forma, os resultados não apresentados nesta etapa serão realizados/executados assim que possível, e inseridos neste documento.

### **6.4 Genotipagem**

#### **6.4.1 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada de acordo com o método de Sambrook (2001) onde inicialmente os micro-organismos foram cultivados em placas nas quais para *L. lactis* R7 foi utilizado o Agar MRS em anaerobiose e incubada por 37°C e para as cepas de *L. monocytogenes* o Agar Oxford, ambas incubadas a 37°C por 48 horas. Com um *swab* foi removido todo cultivo para *eppendorf* contendo 1 mL de STES e centrifugados a 1300 × *g* 3 min. O sobrenadante foi descartado, em outro tubo o STES foi moderadamente aquecido e logo após o *pellet* ressuspenso em 100µL de STES e adicionadas as pérolas de vidro (0,1ul medido no *eppendorf*). Após, foram adicionados 150 µL de fenol

clorofórmio 1:1 e agitados novórtexpor 1 min. Em seguida foram centrifugados a 13000 × gpor 5 minutos e, posteriormente, coletado o sobrenadante em um novo microtubo etiquetado (anotando-se o volume coletado de 10 em 10 µL) e depois foi precipitado com etanol absoluto (multiplicando por 2 o volume do sobrenadante) e cloreto de sódio (5M) (multiplicando o volume do sobrenadante por 0,1).Na sequência, os microtubos foram estocados a -20°C por 1 hora. Após a estocagem os microtubos foram centrifugados por 20min a 13000 × g e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 125 µL de álcool 70%sendo repetida esta lavagem cuidando para não remover *pellet*. Depois da lavagem os eppendorfs foram incubados invertidos a 37°C para secagem. E finalmente foram eluídos com 35 µL de água ultrapura (Milli-q)e adicionado 1 µL de RNase e depois DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% e logo após armazenados a -80 C°.

#### 6.4.2 Amplificação do DNA por PCR

O gene *luxS* foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1. Foram preparadas reações contendo 16µL de mistura especial para PCR (GoTaq- Promega, Madison, WI USA), 1µl de cada oligonucleotídeo iniciador, 1µL de amostra e 1µL de água ultrapura (Milli-q), totalizando 20µL de volume final. Em um termociclador o gene de *luxS* foi amplificado utilizando o protocolo térmico apresentado na Tabela 2: desnaturação inicial (DI), ciclos 30 de desnaturação (D), anelamento (A) e extensão (E) e extensão final (EF). Os produtos amplificados pela PCR foram analisados em gel de agarose a 1% após eletroforese. A visualização dos fragmentos resultantes foi obtida em foto documentador com transluminação ultravioleta após coloração com *Sybr Safe* (Invitrogen®). A técnica de PCR foi realizada de acordo com protocolo padronizado no laboratório.

**Tabela 2.** Protocolos de tempo e de temperatura utilizados na identificação genotipagem.

Genes	DI	D	A	E	EF	Referências
<i>luxS</i>	5 min 95°C	45s 94°C	30s 55°C	30 s 72°C	10 min 72°C	ZHUN et al. (2008)
23S	5 min 95°C	30s 95°C	30s 55°C	30 s 72°C	7 min 72°C	DUBERNET et al. (2002)

#### **7.4 Investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediado pelo gene *luxSpor quorum sensing* em *L. lactis* subsp. *Lactis*(R7)**

As mono-culturas de cada bactéria foram incubadas em caldo BHI a 37°C. Após 6 horas (fase de crescimento exponencial médio), alíquotas de 50 mL de cada cultura contendo  $1,0-1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> foram centrifugadas a  $3000 \times g$  por 10 min em tubos falcon (50 mL). Um dos tubos contendo a cultura de *L. lactis*R7 foi considerado controle.

Outros tubos contendo a cultura *L. lactis*R7 foram misturados com 50 mL de cultura de células de *L. monocytogenes* proveniente dos 50 mL centrifugados e a células de *L. monocytogenes* inativadas pelo calor.

Cinquenta (50) mL de cultura de *L. monocytogenes* cultivadas durante 6 horas a 37°C foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS; pH 7,0) e inativadas pelo calor durante 1 hora a 80°C (YEUNGET et al., 1998; HANSENet al., 2000). Após a lavagem adicional, as células foram analisadas quanto à viabilidade por meio da contagem em agar BHI. Todas as culturas acima mencionadas foram misturadas e incubadas durante 4 horas a 37°C. Nos tempos(t) = 0, 2 e 4 horas as amostras foram coletadas para isolamento do RNA. Amostras isoladas no tempo (t) = 0 foram usadas como linha de base.

#### **6.6 PCR em tempo real para a investigação do *quorum sensing***

##### **6.6.1 Extração do RNA**

As mono-culturas e a co-culturas tiveram o RNA extraído por meio da técnica descrita por SILVA (2015) na qual as células foram submetidas a extração de RNA total. Para isso, foram adicionadas a 1mL de TRIzol® \*(ZymoResearch, EUA) e mantidas por 5 min a temperatura ambiente (TA), para ocorrer lise celular. Após este tempo, foram adicionados 200µL de clorofórmio em cada uma das amostras que foram agitadas manualmente por inversão. Após 3 min, em temperatura ambiente, cada uma das amostras foi centrifugada a  $12.000 \times g$  por 15 min a 4°C.

Foram separadas três fases, sendo um sedimento branco (DNA), uma fase incolor (RNA) e uma rósea (proteínas). A fase incolor foi transferida para um microtubo (1,5 mL), no qual foram adicionados 500µL de isopropanol e mantido por 10 min a temperatura ambiente, para precipitação de RNA. Foi



feita nova centrifugação a  $12.000\times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com  $500\ \mu\text{L}$  de etanol absoluto (Synth®) diluído a 75% (v/v), seguido de centrifugação por mais 5 min a  $10.500\times g$ . Após todo o processo, o extrato contendo RNA foi adicionado de solução aquosa a 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato - DEPC (Sigma-Aldrich®, EUA) e mantido por 10 min a  $60^{\circ}\text{C}$  para facilitar sua dissolução. Logo após cada extração foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **6.6.2 Análise da pureza e integridade do RNA extraído**

O grau de pureza de cada amostra de RNA total extraído das células de *L. monocytogenes* foi avaliado em espectrofotômetro pela leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Valores de razão entre as leituras em 260 e 280 nm acima de 1,8 indicaram pureza adequada das amostras para utilização nos experimentos de quantificação da expressão gênica. Razões inferiores indicam a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou próximo a 280nm. Pela leitura no espectrofotômetro a 260 nm também foi possível quantificar o RNA presente nas amostras (ng/ $\mu\text{l}$ ) e os extratos foram posteriormente diluídos com água DEPC (Sigma-Aldrich®) para obter soluções contendo 40ng/ $\mu\text{l}$ . Em seguida, o extrato contendo o RNA foi tratado, conforme instruções do fabricante, com o kit *DNase I RNase-free* (ThermoScientific®, Lituânia) para remoção de DNA contaminante.

Amostras contendo RNA também foram analisadas por eletroforese para verificação de sua integridade. Para isso, foi preparado gel de agarose (Axygen, EUA) 1,2% (p/v) em tampão Tris/Borato/EDTA – TBE (Invitrogen®) preparado com água DEPC (Sigma-Aldrich®). Como marcador de peso molecular na eletroforese (100 a 5000 pb) será utilizado 1  $\mu\text{l}$  do *GeneRuler Express DNA Ladder* SM1551 (ThermoScientific, EUA). Uma alíquota de 2 $\mu\text{L}$  de cada amostra contendo RNA foi misturada com 3 $\mu\text{l}$  de água ultra purificada (MilliQ®, Millipore, EUA) e 5 $\mu\text{l}$  de solução 0,07% (p/v) de azul de bromofenol (Bio-Agency®, Brasil). O volume total da solução assim preparada (10  $\mu\text{l}$ ) foi aplicado no gel de agarose. A eletroforese ocorreu com tampão TBE por 40 min, numa corrente elétrica 1,81A a 90V (PowerPac™, BioRad, EUA).

O gel de agarose foi corado com solução de brometo de etídeo (Synth®)

a 0,5 µl/mL e observado em transiluminador ultravioleta para foto documentação (MiniBis UV, DNR Bio-Imaging Systems, Israel).

A amostra foi considerada íntegra se estiverem presentes no gel de agarose duas bandas com pesos moleculares de aproximadamente 1000pb e 1500pb, correspondentes respectivamente às frações 16S e 23S do RNA ribossomal bacteriano.

### 6.6.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA foram diluídas para obter uma concentração de 100ng/µl e, em seguida, foi realizada a reação para a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir do RNA extraído. Para isso, foram seguidas as instruções do kit *High-Capacity DNA Reverse Transcription* contendo inibidor de RNase (n° 4374966, Applied Biosystems, EUA). As amostras de cDNA foram mantidas a -20°C até a realização do ensaio de PCR em tempo real. O cDNA foi analisado por monoplex PCR em tempo real, para a quantificação da expressão dos genes relacionados ao QS (genes *luxS* e *23S rRNA*), conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão gênica por qRT-PCR.

Primers	Sequencias (5'-3')	Produto	Referencias
<i>luxS</i> -f	CTTGCCCCTTATGTCCGTTT	99pb	Jenabianet al. (2011)
<i>luxS</i> -r	GGCATTTCGCATTAGGTTGAA	99pb	Jenabianet al. (2011)
<i>23S rRNA</i> -f	TGTCAGGTGGGCAGTTTGAC	43pb	Jenabianet al. (2011)
<i>23S rRNA</i> -f	TTGAGCGCCTCCGTTACAC	43pb	Jenabianet al. (2011)
<i>16S-rRNA</i> -f	GATGCATAGCCGACCTGAGA	35pb	Silva (2015)
<i>16S-rRNA</i> -r	TGCTCCGTCAGACTTTTCGTC	35pb	Silva (2015)

### 6.6.4 PCR quantitativo de transcrição reversa (qRT-PCR)

A transcrição reversa utilizando o Reagente de Transcrição Reversa TaqMan foi conduzida como descrito por Moslehi-Jenabiane colaboradores (2009) onde a síntese do cDNA foi realizada utilizando o Reagente de Transcrição Reversa TaqMan num volume final de 100 µl; 1 µg de RNA foi transcrito reversamente com 5 µl de iniciadores hexâmeros aleatórios (50 µM), 20 µl de mistura de dNTP (10 mM, 2,5 mM cada dNTP) e 2,5 µl de

*Transcriptase Reversa MultiScribe* (50 U /  $\mu$ l), 10  $\mu$ l 10  $\times$  tampão de PCR, 22  $\mu$ l de solução de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2  $\mu$ l de inibidor da RNase (20 U /  $\mu$ l) e ajustado para 100  $\mu$ l utilizando água de graduação molecular. Para cada amostra, foi incluído um controle de transcriptase não reversa para confirmar a ausência de DNA contaminante. A síntese de cDNA foi realizada num GeneAmp PCR System 9700 com as seguintes condições cíclicas: 25°C durante 10 min (incubação), 48°C durante 30 min (transcrição reversa), 95°C durante 5 min (inativação de a enzima). O cDNA foi armazenado a -80°C. Um controle de transcriptase não reversa foi incluído para confirmar a ausência de DNA contaminante.

As ampliações por qRT-PCR foram realizadas com pelo menos três réplicas biológicas usando a Química Baseada em Sonda TaqMan em triplicata em um Sistema de PCR em Tempo Real 7500. O gene *housekeeping 23S rRNA* foi escolhido para normalizar as quantidades de RNA (controle interno) de acordo com Weiss e Jespersen (2010). A adequação do gene *housekeeping* foi verificada pelo isolamento do DNA genômico e do RNA durante os experimentos. A sequência que codifica para os genes *luxS* (NC\_006814 LBA 1081) e *23S rRNA* (NC\_006814 LBA\_2002) de *L. lactis* R7 foi recuperada a partir das bases de dados GenBank EMBL. Os oligonucleotídeos iniciadores relacionados ao *quorum sensing* (Tabela 1) foram concebidos utilizando o software Primer Express v3.0. O cDNA diluído equivalente a 1 ng de material de partida de RNA foi utilizado como molde para a amplificação por qRT-PCR como descrito anteriormente (Jenabian et al., 2011). O nível transcricional de *luxS* foi normalizado para o nível transcricional do gene *23S rRNA*. As alterações relativas (x vezes) no nível de transcrição em amostras induzidas e de linha de base foram calculadas como descrito por Pfaffl (2001).

Os ensaios foram realizados considerando um limiar de detecção (“*threshold*”) de 0,014, sendo que os valores de Ct (“*cycle threshold*”) correspondem ao ciclo de amplificação em fase exponencial onde ocorre a intersecção com este limiar (GRADY et al., 2008).

Os valores de Ct foram utilizados para avaliar a expressão diferencial dos genes salvos nas diferentes condições e, para isso, foi calculado o  $\Delta\Delta$ CT. Conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001), a expressão gênica foi

calculada com a fórmula  $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial e  $\Delta CT$  representa a diferença entre o CT do gene alvo de interesse amplificado e o CT do gene controle endógeno amplificado. O  $\Delta\Delta CT$  representa a diferença entre o  $\Delta CT$  da amostra teste e o  $\Delta CT$  da amostra de referência - calibrador.

Para fazer a comparação das amostras, os valores de Ct obtidos foram normalizados e calibrados, conforme as fórmulas abaixo:

Normalização:  $Ct_{(gene\ alvo)} - Ct_{(controle\ end\ ógeno)} = \Delta Ct$  - Calibração:  $\Delta Ct_{(co-cultura)}$   
-  $\Delta Ct_{(mono-cultura)} = \Delta\Delta Ct$

Em seguida foram avaliados quanto ao nível de expressão gênica pela fórmula:  $QR$  (nível de expressão gênica) =  $2^{-\Delta\Delta CT}$

Os valores da expressão gênica de cada amostra foram representados em unidades arbitrárias.