

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

*mestrado*

**BC/50884**

**IB/ 81823**

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS****Expressão diferencial de genes em linhagens de  
*Escherichia coli* submetidas ao tratamento com cloro**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
RENATA OGUSUCU
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Laura m. m. Ottoboni***RENATA OGUSUCU****Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para  
obtenção do Título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular na área de Genética de  
Microrganismos.

**Campinas, 2002**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IB/81823  
Nº CHAMADA UNICAMP  
Og9e  
V \_\_\_\_\_ EX 8  
TOMBO BCI 50884  
PROC 16.83F102  
C \_\_\_\_\_ DX \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 12/09/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

ii

CM00173030-2

BIB 10 257452

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

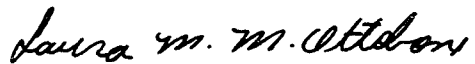
**Og9e**      **Ogusucu, Renata**  
Expressão diferencial de genes em linhagens/de *Escherichia coli*  
submetidas ao tratamento com cloro/Renata/Ogusucu.--  
Campinas, SP:[s.n.], 2002

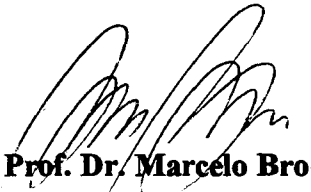
Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

1. *Escherichia coli*. 2. Estresse ambiental. 3. Cloro. 4. Expressão  
diferencial. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual  
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Data da defesa: 30 de julho de 2002.**

**Banca Examinadora:**

  
**Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni (orientadora)**

  
**Prof. Dr. Marcelo Brocchi**

  
**Prof. Dr. Domingos da Silva Leite**

**Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini**

- “ - Por favor, você poderia me dizer que caminho devo tomar para ir embora? – disse Alice  
- Isso depende em grande parte do lugar onde você quer ir – respondeu o gato.  
- Não me importa muito onde...- disse Alice.  
- Neste caso, pouco importa o caminho que você tomar – declarou o gato.  
- ... contanto que chegue em algum lugar – respondeu Alice.  
- Oh - disse o gato – você pode estar certa de chegar lá, só que vai andar muito tempo.”

- Lewis Carroll, “Alice no país das Maravilhas”

Aos meus pais,  
pelo carinho, confiança e entusiasmo (algumas broncas também),  
dedico

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, pela orientação durante o mestrado e iniciação científica e pelo interesse com que acompanhou meus projetos e minha formação científica;

À Dra. Maria Inês Zanoli Sato, pela dedicação e entusiasmo, essenciais para a realização deste trabalho;

Ao Eng. Alberto Ferro, à Sheila Gozzo Câmara e aos funcionários da CETESB pela atenção com que me receberam durante a realização de experimentos na Estação de Tratamento de Água do Baixo Cotia;

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela participação na banca examinadora e leitura criteriosa na pré-banca;

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Dra. Vera Nisaka Solferini pela participação na banca examinadora;

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano e Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman pelas sugestões da pré-banca;

Às secretárias do CBMEG Tânia, Sandra, Fabiana, Andressa e Patrícia, pela eficiência com que desempenham seu trabalho;

Ao Rogério, Renato, Cintia, Erick, Ricardo, Ana, Bianca, Wagner, Fábio, Fernanda, Luciana, Lu Kauer, Edna, Jorge e Teresa, pelo incentivo, amizade, apoio, opiniões e por tornarem a realização deste trabalho muito mais fácil;

Aos palmeirenses Renato e Wagner, pelo bom senso;

Ao Ricardo pelo carinho, por ser uma pessoa com quem sempre se pode contar e, por não permitir que o dia a dia se transforme em rotina;

À Andréia, Alexandre e Claudete, pela grande amizade, paciência e generosidade;

Aos meus pais, Eirro e Jorgina, e ao meu irmão, Amauri, pelo amor, incentivo e por nunca me permitirem desanimar;

À FAPESP, pelo apoio financeiro (processo 00/01405-4).

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>01</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>03</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>05</b>
1. <i>Escherichia coli</i> .....	06
2. A desinfecção da água.....	09
3. Avaliação da água.....	13
4. Resposta a estresse em <i>Escherichia coli</i> .....	16
5. A bacia do rio Cotia.....	19
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> .....	25
2. Preparo de cultura permanente das linhagens.....	25
3. Crescimento e sobrevivência na presença de cloro.....	25
4. Efeito do cloro nas linhagens de <i>E. coli</i> após permanência nas águas do rio Cotia.....	26
5. Isolamento de RNA.....	28
6. RAP-PCR.....	29
6.1. Tratamento do RNA com DNase.....	29
6.2. Síntese de cDNA.....	29
6.3. PCR a partir do cDNA e eletroforese das amostras amplificadas.....	30
7. Isolamento e reamplificação dos fragmentos diferenciais.....	30
8. <i>Slot blot</i> .....	31
9. Hibridização das membranas de <i>slot blot</i> .....	31
10. Análise dos sinais de hibridização dos experimentos de <i>slot blot</i> .....	32
11. Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos diferenciais.....	33
12. Técnicas padrões de biologia molecular.....	33

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
1. Sobrevivência das linhagens ATCC 25922 e 4219 na presença de estresse.....	35
2. Isolamento de fragmentos expressos diferencialmente.....	44
3. Confirmação e análise da expressão diferencial dos fragmentos isolados através de RAP-PCR.....	62
4. Clonagem e seqüenciamento.....	71
 <b>CONCLUSÕES.....</b>	 <b>80</b>
 <b>APÊNDICE.....</b>	 <b>83</b>
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	 <b>87</b>

## RESUMO

A espécie *Escherichia coli* é o principal microrganismo utilizado como indicador da qualidade sanitária da água destinada ao consumo humano. Alguns problemas na utilização de *E. coli* como indicador de qualidade sanitária se referem a possibilidade desta bactéria sofrer injúria ou entrar no estado “viável, mas não cultivável” quando liberada no ambiente. Nestas situações, a concentração destas bactérias em uma amostra analisada pode ser subestimada devido a sua incapacidade de crescer em meios seletivos normalmente utilizados para detecção e identificação de microrganismos.

A permanência de bactérias entéricas, como *E. coli*, no ambiente é considerada uma condição de estresse devido à baixa disponibilidade de nutrientes e variações de temperatura, pH, luminosidade e salinidade. Alguns estudos relacionam o aumento da resistência de microrganismos ao processo de desinfecção, quando previamente cultivados sob limitação de nutrientes. Este fator é especialmente preocupante em estações de tratamento, uma vez que os microrganismos presentes na água estão estressados e podem apresentar resistência aumentada ao processo de desinfecção ou não serem detectados pelas metodologias tradicionais.

Considerando estes fatores, a proposta deste projeto foi verificar a expressão gênica diferencial na linhagem ATCC 25922 e na linhagem 4219 de *E. coli* quando tratadas com cloro após cultivo em laboratório e após cultivo em água de rio. Para a realização destes experimentos o ponto de coleta de água escolhido foi o local de captação de água da estação de tratamento do Baixo Cotia, pertencente a SABESP. Este local foi escolhido por apresentar alto grau de contaminação por efluentes domésticos e industriais e por integrar o sistema de abastecimento de água da Região Metropolitana de São Paulo.

Inicialmente, foram realizadas curvas de crescimento da linhagem ATCC 25922 e da linhagem 4219 em condições ideais (meio LB, 37°C, 250 rpm) e curvas de sobrevivência das duas linhagens submetidas ao tratamento com 10 mg/L de cloro, submetidas ao cultivo em água do rio Cotia por 3 dias e tratamento com 10 mg/L de cloro após cultivo em água. A partir da análise das curvas de sobrevivência foram definidas as condições dos tratamentos estressantes para extração de RNA.

A expressão gênica diferencial foi analisada por RAP-PCR (*RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction*) utilizando-se RNA extraído de amostras das duas linhagens nas

condições citadas acima. A partir dos géis de RAP-PCR foram obtidos 351 fragmentos diferenciais. Destes, 224 tiveram expressão diferencial confirmada por experimentos de *slot blot*.

Os sinais de hibridização de cada fragmento analisado nos experimentos de *slot blot* foram quantificados e normalizados e, com esses valores foram calculados os coeficientes de expressão para cada fragmento. Os fragmentos que apresentaram coeficiente de expressão maior do que 1 representavam os cDNAs que tiveram a expressão induzida em resposta ao tratamento com cloro tanto em amostras cultivadas previamente em LB, como em amostras cultivadas previamente em água. Coeficientes de expressão com valores menores que 1 representavam os fragmentos reprimidos pelo tratamento com cloro.

Dezoito fragmentos (8 da linhagem 4219 e 10 da linhagem ATCC 25922) com os maiores coeficientes de expressão foram selecionados para clonagem e seqüenciamento.

Entre as 8 seqüências obtidas para a linhagem 4219, foi encontrada similaridade com: 1) uma provável sintase de *E. coli* K12; 2) com uma provável permease de *E. coli* K12 e, 3) com a enzima orotato fosforibosiltransferase de *E. coli* K12. Cinco fragmentos não apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em banco de dados.

Foram analisadas 10 seqüências obtidas da linhagem ATCC 25922. Foi observada similaridade com: 1) *orf* de *E. coli* K12 ainda não caracterizada; 2) provável região TPR de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2; 3) fosfo- $\beta$ -glucosidase críptica de *Escherichia coli* O157:H7; 4) gene *rcaA* de *Escherichia coli* O157:H7; 5) proteína hipotética de *Escherichia coli* O157:H7. Cinco fragmentos seqüenciados não apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados.

A análise dos resultados obtidos neste projeto indicou que a resposta de *E. coli* ao estresse causado por cloro é modificada de acordo com o tipo de cultivo anterior ao tratamento. A identificação de genes com expressão alterada pode auxiliar na elucidação da resposta de *E. coli* ao processo de desinfecção e a influência do estresse ambiental nesta resposta.

## SUMMARY

*E. coli* is the main indicator of water potability however, these bacteria can enter in the “viable but nonculturable” state in the environment. In such cases, it is hard to estimate the concentration of the bacteria in an accurate manner, due to their incapacity of growing in selective media that is routinely used for the detection and identification of microorganisms.

The permanence of enteric bacteria, such as *E. coli*, in the environment is considered a stressful condition, because of the low availability of nutrients and the oscillation of temperature, pH, luminosity and salinity. Some works relate an increase in the microorganisms resistance to the disinfection process, after previously growth under starvation. This is a concerning reason in water treatment plants, once the enteric bacteria in water are stressed they may not be eliminated or detected by traditional methods.

Considering these problems, the aim of this project was to verify the differential gene expression in the *E. coli* strains ATCC 25922 and 4219, when treated with chlorine after cultivation in LB broth and after cultivation in water. For these experiments, water from the Cotia river was collected at the water treatment plant of Baixo Cotia, in Carapicuíba, State of São Paulo. This water treatment plant is administrated by SABESP. This site was chosen because of the high level of contamination by domestic and industrial effluents and because it integrates the water supply system of the city of São Paulo.

In order to determine the parameters for RNA extraction of stressed samples, growth curves of strain ATCC 25922 and 4219 in standard conditions (LB broth, 37°C, 250 rpm) and survival curves, of both strains submitted to treatment with 10 mg/L of chlorine, cultivation in water from Cotia River for 3 days and cultivation in water and treatment with 10 mg/L of chlorine, were constructed.

Differential gene expression was analyzed by RAP-PCR (RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction) experiments, using RNA extracted from samples of the ATCC 25922 and 4219 strains stressed in the conditions mentioned above. A total of 351 differential fragments were isolated from the RAP-PCR gels and 224 fragments had the differential expression confirmed by slot blot.

The hibridization signals of each fragment, in the slot blot experiments, were quantified and normalized and these values allowed the estimation of the expression coefficients for each

fragment. Expression coefficients higher than 1 indicated fragments whose expression was induced by treatment with chlorine in samples previously cultivated in LB or water. Expression coefficients lower than 1 indicated fragments that were repressed by the chlorine treatment.

Eighteen fragments (8 from the 4219 strain and 10 from the ATCC 25922 strain) with expression coefficients higher or approximately equal to 2 were selected for cloning and sequencing.

Among the 8 sequences that were obtained from the 4219 strain, 3 presented similarity with: 1) a putative synthase of *E. coli* K12, 2) a putative permease of *E. coli* K12 and 3) with the enzyme orotate phosphoribosyltransferase of *E. coli* K12. Five sequences did not show similarity with sequences from GenBank.

Among the 10 sequences from the ATCC 25922 strain, 5 presented similarity with: 1) an orf from *E. coli* K12, 2) a putative TPR repeat from *Salmonella enterica* Typhimurium LT2, 3) a cryptic phospho- $\beta$ -glucosidase from *E. coli* O157:H7, 4) a *rcsA* gene from *E. coli* O157:H7 and 5) a putative protein from *E. coli* O157:H7. Five sequences did not show similarity with sequences from GenBank.

The analysis of the results obtained in this project suggested that the response of *E. coli* to chlorine stress changes according to the previous cultivation conditions. The identification of differentially expressed genes may help in the elucidation of the response of *E. coli* for the disinfection process. Information about the influence of environmental stress in the chlorine response is also obtained.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. *Escherichia coli*

A família *Enterobacteriaceae*, da qual o gênero *Escherichia* faz parte, é um grupo filogenético relativamente homogêneo, composto por bactérias que não esporulam, Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, oxidase-negativas e capazes de fermentar açúcares (Bopp *et al.*, 1999). Um grande número de isolados da família *Enterobacteriaceae* vem sendo bastante estudado devido ao seu potencial patogênico para animais e a sua relevância para a indústria (Madigan *et al.*, 1997).

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies: *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*. A *E. coli* foi identificada por Theodor Escherich em 1885 e, desde então, vem sendo utilizada como modelo em estudos sobre fisiologia, bioquímica, recombinação e regulação gênica em microrganismos (Madigan *et al.*, 1997).

A espécie *Escherichia coli* é habitante normal dos intestinos de vários animais. Porém, são conhecidas linhagens patogênicas que causam diarreia, infecções no trato urinário e bacteremia tanto em indivíduos saudáveis como em imunossuprimidos (Madigan *et al.*, 1997; Bopp *et al.*, 1999). As linhagens patogênicas são divididas em seis grupos conhecidos: as enteroinvasivas (EIEC), enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC) e enterohemorrágicas (EHEC), também chamadas de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC – *Shiga toxin-producing E. coli*), enteroagregativas (EAEC) (US FDA, 1998; Kuhnert *et al.*, 2000) e extraintestinais (Johnson & Russo, 2002).

As linhagens enteroinvasivas (EIEC) provocam infecções com sintomas frequentemente confundidos com os de infecções causadas por *Shigella*. Em ambos casos, as células bacterianas invadem as células do epitélio intestinal, onde se proliferam e se movem para células adjacentes causando inflamação e lesões no tecido, provocando desenteria, com possível perda de sangue, muco e pode ser acompanhada de febres (Nataro & Kaper, 1998). Cerca de 10 células podem ser suficientes para o início da infecção, que normalmente é auto-limitante e não causa maiores complicações em adultos (US FDA, 1998; Bopp *et al.*, 1999).

Os principais sintomas de infecção por linhagens enteropatogênicas (EPEC) são diarreia, vômito e febre, podendo deixar sequelas como desnutrição, perda de peso e crescimento retardado. Estas linhagens não são invasivas, porém, possuem mecanismos que permitem que se

liguem fortemente às células do epitélio intestinal (histopatologia *attaching and effacing*), provocando destruição das microvilosidades (Kuhnert *et al.*, 2000) e reorganização do citoesqueleto (Nataro & Kaper, 1998).

As linhagens enterotoxigênicas de *E. coli* (ETEC) é um dos microrganismos causadores da diarreia do viajante e também está relacionada a gastroenterite, principalmente em crianças. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é auto-limitante, mas inspira maiores cuidados em imunossuprimidos (USA FDA, 1998; Bopp *et al.*, 1999). Linhagens ETEC produzem enterotoxinas termo-lábeis (LTs) e/ou termo-estáveis (STs) (Bopp *et al.*, 1999). As enterotoxinas termo-lábeis são codificadas por genes plasmidiais, que reconhecem os mesmos receptores e apresentam a mesma estrutura, sequência de aminoácidos e atividade enzimática da enterotoxina codificada pelo *Vibrio cholerae* (Madigan *et al.*, 1997; Nataro & Kaper, 1998). As toxinas termo-estáveis são codificadas por genes plasmidiais e por genes encontrados em transposons. São conhecidas duas toxinas termo-estáveis designadas como STa e STb. A STa provoca alteração no funcionamento dos canais de transporte de íons presentes nas células epiteliais do hospedeiro, causando aumento da secreção de fluídos por estas células (Sears & Kaper, 1996). Já a Stb provoca perda ou atrofia das vilosidades das células epiteliais, porém é raramente encontrada em isolados de humanos, sendo mais comum em isolados de porcos (Nataro & Kaper, 1998).

A linhagem de *E. coli* O157:H7 foi a primeira linhagem a ser designada como enterohemorrágica (EHEC) ou produtora de toxina Shiga (STEC) (Mead & Griffin, 1998). Surtos causados pela O157:H7 foram bem documentados nos Estados Unidos, Japão e Europa ocidental. As infecções foram relacionadas com as mais variadas fontes, como o consumo de carne bovina e leite (Pierard, 1992; Griffin, 1995; Wall *et al.*, 1996), salame (Keene *et al.*, 1997), alface (Mermin *et al.*, 1996), rabanete (*National Institute of Health and Infectious Disease*, 1997), alfafa (CDC, 1997), suco de maçã (Dingman, 2000), salsicha (Cheville *et al.*, 1996), maionese (Weagant *et al.*, 1994) e iogurte (Morgan *et al.*, 1993). A ingestão de água contaminada e a prática de esportes em água não tratada também foram relacionadas a epidemias de O157:H7 (Akashi *et al.*, 1994; Keene *et al.*, 1994).

A linhagem O157:H7 persiste por períodos prolongados no ambiente, facilitando a sua disseminação. Amostras inoculadas em água potável podem resistir por até 11 dias à 5°C, sem que haja redução da viabilidade das células (Lisle *et al.*, 1998). O gado é considerado um reservatório natural desta linhagem, porém, amostras já foram isoladas de ovelhas, cavalos, cães,

pássaros e moscas (Chapman *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 1998). Uma hipótese para a contaminação de vegetais por *E. coli* O157:H7 seria a utilização de água contaminada para irrigar as plantações ou a utilização de fezes como fertilizantes (Beuchat, 1999).

Os principais sintomas da infecção por O157:H7 são diarreia com ou sem eliminação de sangue e síndrome urêmica hemolítica (Bopp *et al.*, 1999). O termo síndrome urêmica hemolítica se refere a um grupo de doenças caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal (Ray & Liu, 2001). As crianças apresentam maior risco de sofrerem síndrome urêmica hemolítica por apresentarem níveis elevados de receptores para toxina *Shiga-like* nos rins. Em adultos, o desenvolvimento da doença requer efeito combinado da toxina *Shiga-like* com endotoxinas para que ocorra sensibilização do tecido renal (Madigan *et al.*, 1997; Ray & Liu, 2001).

O diagnóstico de infecção por O157:H7 é dificultado devido a algumas particularidades da doença como por exemplo, a ausência de febre (comum em pacientes que sofrem infecção) e as alterações no aspecto do abdômen similares as de um paciente com apendicite (Mead & Griffin, 1998). A linhagem O157:H7 não fermenta sorbitol em um período de 24 horas e não produz  $\beta$ -glucoronidase, características utilizadas para identificação de *E. coli* em meios de cultura seletivos, dificultando a detecção desta bactéria por metodologias tradicionais (Law, 2000). A linhagem O157:H7 produz dois tipos de toxinas *Shiga-like*, além de possuir o plasmídeo EAF relacionado a virulência que codifica a hemolisina, uma enzima que permite a utilização do sangue do hospedeiro para obtenção de ferro, e genes de adesão celular necessários para a colonização do epitélio intestinal e que provocam a alteração da borda em escova (Mead & Griffin, 1998; Law, 2000).

As toxinas *Shiga-like* são codificadas por genes de bacteriófagos, de modo que podem ser adquiridos por diferentes linhagens de *E. coli*. Porém, acredita-se que a habilidade da bactéria em produzir estas toxinas esteja relacionada a presença de outros genes de patogenicidade e por isso, apenas alguns sorotipos expressam estas toxinas (Law, 2000). A *E. coli* O157:H7 pode produzir a toxina *Shiga-like* 1 (Stx1), idêntica a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* e a toxina *Shiga-like* 2 (Stx2), que apresenta 56% de homologia com a toxina *Shiga-like* 1 (Mead & Griffin, 1998). Além dos sintomas conhecidos de infecção intestinal, as toxinas *Shiga-like* podem provocar a síndrome urêmica hemolítica, ao atingirem as células endoteliais dos rins e, em casos mais sérios, afetam as células glomerulares e dos túbulos renais (Ray & Liu, 2001).

Linhagens EAEC estão associadas a diarreia em crianças, principalmente nos países em desenvolvimento (Kuhnert *et al.*, 2000). Ao infectarem a mucosa intestinal, as linhagens EAEC provocam aumento da secreção de muco pelo tecido, formando um biofilme em torno das células bacterianas, permitindo colonização persistente e dificultando a absorção de nutrientes pelo hospedeiro (Nataro & Kaper, 1998). Após a colonização, estas bactérias secretam toxinas provocando o encurtamento das vilosidades das células epiteliais do hospedeiro, necrose, hemorragia e edemas. Pacientes infectados com linhagens EAEC frequentemente apresentam diarreia com possível perda de sangue, febre e vômito (Kuhnert *et al.*, 2000).

As linhagens de *E. coli* extraintestinais (ExPEC) são uma das principais causadoras de meningite neonatal, alguns tipos de pneumonia, bacteremia e infecções no trato urinário (Johnson & Russo, 2002; Kuhnert *et al.*, 2000). Os fatores de virulência de linhagens ExPEC incluem adesinas, cápsulas polissacarídeas, toxinas, proteases, invasinas e proteínas de resistência a mecanismos de defesa do hospedeiro. Estas características permitem a colonização de mucosas, provocam lesões e estimulam respostas inflamatórias no hospedeiro (Johnson & Russo, 2002). A análise de genes de virulência de linhagens ExPEC indicou um conteúdo de G+C não característico de *E. coli*, sugerindo que estes genes tiveram origem em outras espécies (Dobrindt *et al.*, 2001).

## **2. A desinfecção da água**

Patógenos como bactérias, vírus, protozoários e helmintos são frequentemente transmitidos a humanos ou animais através de alimentos e de água contaminados por fezes (Toze, 1999). Atualmente, cerca de 2,4 bilhões de pessoas vivem em locais sem saneamento básico e aproximadamente, 250 milhões de pessoas por ano são infectadas com algum patógeno através da água, resultando em 4 milhões de mortes, principalmente, nos países em desenvolvimento (*World Health Organization*, 2002).

Em 1854, após uma epidemia de cólera em Londres, é que a transmissão de doenças entéricas foi relacionada a contaminação de água potável por esgotos (Bates, 2000) e, partir de então, houve a reavaliação do sistema de distribuição e tratamento de água e esgoto (Edberg *et al.*, 2000) e em 1890, iniciou-se a aplicação de cloro, um método efetivo, barato e relativamente

simples, para eliminar microrganismos da água (Edberg, 2000). Desde então, este é o método mais utilizado com esta finalidade (Bitton, 1994; Dukan *et al.*, 1997).

Em estações de tratamento de água, o cloro ( $\text{Cl}_2$ ) é utilizado na forma gasosa ou líquida. Ao ser acrescentado à água, produz ácido hipocloroso e o íon hipoclorito. Neste estágio, a água deve ser mantida com pH entre 6 e 7 para favorecer o aumento da concentração de ácido hipocloroso em solução, já que este composto é 80 vezes mais eficiente na eliminação de *E. coli* que outros derivados de cloro (Bitton, 1994). O cloro normalmente não é volatilizado rapidamente e, por isso, nas tubulações que transportam a água potável, é possível detectar atividade residual do desinfetante (Bitton, 1994). Embora esta característica seja interessante, pela possibilidade de eliminar microrganismos que entrem em contato com a água durante o transporte e reduzir a formação de biofilmes, foi observado que linhagens de *E. coli* O157:H7 desenvolvem resistência a este desinfetante quando expostas a baixas concentrações, como as encontradas nas tubulações (Lisle *et al.*, 1998).

O cloro provoca alteração na estrutura da membrana celular de bactérias, afetando a permeabilidade, além de danificar ácidos nucléicos e enzimas, reduzindo a atividade metabólica do organismo (Venkobachar *et al.*, 1977; Camper & McFeters, 1979; Haas & Engelbrecht, 1980; Berg *et al.*, 1986; Bitton, 1994). Em partículas virais, causa deterioração do material genético (Bitton, 1994).

A reação entre o cloro e a água produz trihalometanos, como clorofórmio, diclorometano, bromodiclorometano, dibromoclorometano, 1,2-dicloroetano e tetracloreto de carbono. Suspeita-se que todos estes produtos tenham potencial carcinogênico e podem estar associados a doenças cardiovasculares (Bitton, 1994; Samarakandi *et al.*, 1997). As alternativas para este problema são: a utilização de desinfetantes que não geram trihalometanos (monocloroaminas, ozônio ou radiação U.V.); remoção de compostos orgânicos que podem ser precursores dos trihalometanos; remoção dos próprios trihalometanos, e ainda, utilização de cloro no tratamento de água seguida da transformação dos seus resíduos em monocloroaminas, através da adição de amônia à água. Este último procedimento é interessante porque também elimina o odor da água (Bitton, 1994).

A formação de biofilmes nas tubulações da rede de distribuição e reservatórios é um grande empecilho na manutenção da qualidade da água nos sistemas de distribuição. Os biofilmes são compostos por vários tipos de microambientes, que permitem o crescimento de microcolônias de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (Characklis & Marshall, 1990). A estrutura do biofilme é

complexa, com as várias microcolônias cercadas por matriz extracelular composta por polímeros orgânicos que aderem à superfície das tubulações (*Center for Biofilm Engeneering*, 1994). Devido à proximidade entre as diferentes colônias de um biofilme, acredita-se que ocorra aumento na troca de material genético, permitindo inclusive, a transferência de genes de resistência à biocidas (Lambert *et al.*, 2001). Embora o cloro seja considerado o desinfetante mais eficiente na destruição de microrganismos, quando há formação de biofilmes, a desinfecção é mais eficiente se forem utilizadas cloraminas (LeChevallier *et al.*, 1990; Rogers *et al.*, 1994). Uma explicação possível é que os polissacarídeos da matriz do biofilme reagem com o cloro, protegendo as bactérias. Já a monoclóroamina atua especificamente sobre o DNA e aminoácidos, não interagindo com a matriz (Stewart *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996).

Eaton *et al.* (1973) observaram que cloraminas causam anemia hemolítica em pacientes que passam por hemodiálise, mas não foram observados efeitos deletérios em humanos que ingeriam cloraminas. Estes desinfetantes têm efeitos mutagênicos em bactérias e ratos (Bitton, 1994) e são tóxicos para peixes e invertebrados (Wolfe *et al.*, 1984). O seu potencial carcinogênico em humanos não foi avaliado.

O dióxido de cloro é um desinfetante bastante usado, por ser tão eficiente quanto o cloro na eliminação de bactérias e vírus (Aieta & Berg, 1986) e, aparentemente, não formar trihalometanos (Bitton, 1994). Porém, a utilização de dióxido de cloro interfere nas funções da glândula tireóide (Condie, 1986) e o cloreto produzido pela reação com a água pode combinar com a hemoglobina, causando anemia (Bitton, 1994).

O ozônio utilizado para desinfecção da água é produzido a partir de uma corrente de ar que passa entre eletrodos e recebe uma alta voltagem (entre 8000 V a 20000 V) (Bitton, 1994). Este método é tão eficiente quanto o cloro na inativação de bactérias e vírus e ainda reduz em grande escala a viabilidade de cistos de protozoários (Edberg *et al.*, 2000). O ozônio também oxida compostos orgânicos, eliminando o sabor, o odor e precursores de trihalometanos presentes na água (Bitton, 1994). A manutenção do equipamento para produzir ozônio nas estações de tratamento, torna esta alternativa muito cara. Atualmente, o ozônio é utilizado apenas como oxidante e não como desinfetante. Pouco se conhece sobre produtos secundários formados pela utilização do ozônio e seus riscos para a saúde humana (Bitton, 1994).

A radiação ultra-violeta também pode ser usada como desinfetante em estações de tratamento de água. Para isto, lâmpadas de mercúrio são revestidas por tubos de quartzo e

colocadas na água. Os tubos permitem a passagem da luz U.V., em um comprimento de onda com potencial biocida, mas seu efeito decai com o tempo (Bitton, 1994). A principal vantagem deste método é a ausência de produtos secundários com efeitos deletérios, sem que haja perda do potencial de eliminar microrganismos. A utilização de U.V. também não deixa a água com sabor ou odor e nem produz compostos carcinogênicos (Oliver & Carey, 1976). Porém, a radiação U.V. não deixa resíduos que podem eliminar microrganismos presentes nas tubulações do sistema de distribuição, facilitando a formação de biofilmes. A manutenção e o custo deste tipo de tratamento também tornam este método menos popular (Bitton, 1994).

Outra opção que pode ser utilizada em conjunto com métodos para desinfecção de água e esgoto é o chamado tratamento biológico, que consiste no desenvolvimento de ecossistemas em unidades de tratamento capazes de adsorver ou degradar a matéria orgânica presente, diminuindo a disponibilidade de nutrientes que poderiam ser utilizados por microrganismos (Volk & LeChevallier, 1999; Bates, 2000). Uma das vantagens deste tratamento é que não introduz produtos secundários indesejados e a principal desvantagem é que este tratamento é ineficaz na eliminação de geosmina, ácidos húmicos e pesticidas, sendo necessário uma etapa complementar de desinfecção (Bates, 2000).

Bactérias mantidas em laboratório são frequentemente utilizadas para avaliar a performance de desinfetantes. Uma vez que a utilização excessiva de cloro pode gerar produtos secundários indesejados, os testes realizados em laboratório têm como função apontar a dose mínima necessária para desinfetar a água. Para isso, assume-se que a sensibilidade de bactérias de laboratório é semelhante à de microrganismos de ambientes naturais, embora essa premissa possa conduzir a erros de avaliação (Matin & Harakeh, 1990).

Populações naturais são normalmente encontradas em agregados, ligadas a alguma superfície. Este comportamento provavelmente afeta a sensibilidade destas populações aos desinfetantes (Matin & Harakeh, 1990). Berg *et al.* (1979) observaram que populações de *E. coli* isoladas do meio ambiente são visivelmente mais resistentes ao cloro e ao dióxido de cloro do que populações de laboratório, mas quando as populações naturais são cultivadas por um certo período em laboratório, tornam-se mais sensíveis aos desinfetantes. A mesma conclusão foi obtida por Griebble *et al.* (1970) e Rhoades & Short (1970) estudando a inativação de *Pseudomonas aeruginosa* por ácido acético.

### 3. Avaliação da água

Um dos métodos mais comuns para verificar a qualidade da água é a contagem do número de colônias de coliformes fecais visíveis em meio seletivo (*World Health Organization* b, 2002). Nestes testes, assume-se que a inativação dos microrganismos indicadores representa a inativação dos microrganismos patogênicos e que a ausência de crescimento significa a morte da bactéria (Matin & Harakeh, 1990; Tryland *et al.*, 1998).

O grupo dos coliformes é composto por organismos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, capazes de fermentar lactose, produzir gás e ácidos e sintetizar a enzima  $\beta$ -D-galactosidase (Madigan *et al.*, 1997; Edberg *et al.*, 2000). Por esta classificação são considerados coliformes linhagens dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*. Dentre os representantes destes gêneros, apenas *Escherichia coli* está necessariamente associada à contaminação fecal (Edberg *et al.*, 2000), por isso, dentre os coliformes, é a espécie mais utilizada como indicador da qualidade sanitária da água destinada ao consumo humano (Edberg *et al.*, 2000).

A determinação do número de unidades formadoras de colônia em meio de cultura seletivo é o método de escolha para análise da potabilidade da água, porém, outros métodos para detecção de contaminação por bactérias são conhecidos (*World Health Organization* b, 2002).

Embora a utilização de coliformes como indicadores torne a avaliação da água mais rápida, é preciso observar que os diferentes microrganismos presentes em um ambiente aquático podem apresentar graus diferentes de sensibilidade ao tratamento (Toze, 1999). O método de avaliação também deve permitir o conhecimento do número de patógenos presentes na amostra, uma vez que para o início de infecções bacterianas, são necessárias cerca de  $10^3$  células e para infecções causadas por vírus entéricos ou *E. coli* O157:H7 apenas 10 partículas infecciosas são suficientes, por essa razão, mesmo em baixas concentrações, a presença destes microrganismos é preocupante (U.S. EPA, 1992; Kolling & Matthews, 2001).

No ambiente, além da integridade e do estado fisiológico da célula, outros fatores como a temperatura, luminosidade, salinidade, chuvas, predação, concentração de nutrientes e poluição ambiental afetam a eficiência dos métodos de detecção e quantificação dos microrganismos (Solo-Grabriele *et al.*, 2000).

A concentração de células pode ser determinada por métodos que se baseiam na coloração do DNA, com compostos como o DAPI (4,6-di-amidino-2-fenilindol) e o laranja acridina, também é possível relacionar o grau de contaminação com a concentração de proteínas, lipídeos, ATP e a detecção da atividade da cadeia de transporte de elétrons, sinalizando a respiração celular e a microautoradiografia que determina a atividade da célula através do fornecimento de substratos marcados radioativamente à amostra (Vollertsen *et al.*, 2001). Os métodos baseados em técnicas moleculares são bastante sensíveis, mas seus custos ainda são proibitivos, principalmente, em países em desenvolvimento (Szakál *et al.*, 2001). Testes baseados em imunoenaios são menos sensíveis que técnicas moleculares e para aumentar a sua eficiência é necessário o enriquecimento da amostra, como nos métodos tradicionais (Szakál *et al.*, 2001). A determinação da presença de microrganismos baseada em testes que verifiquem a atividade de enzimas específicas tem como principais desvantagens a incapacidade de detectar células estressadas e a não diferenciação de espécies patogênicas de não-patogênicas (Fiksdal *et al.*, 1994)

O kit LIVE/DEAD BacLight tem se mostrado eficiente tanto para determinação da concentração de células bacterianas em uma amostra, como para diferenciação de células danificadas e íntegras (Gardiner *et al.*, 2000; Auty *et al.*, 2001; Chayanan *et al.*, 2001; Ramalho *et al.*, 2001). Este método se baseia na aplicação de 2 corantes para ácidos nucleicos. O SYTO 9 penetra em todas as células, enquanto o iodeto de propídeo penetra apenas em células com membranas danificadas (Boulos *et al.*, 1999).

Os microrganismos utilizados como indicadores (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, estreptococos fecais, *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp) reproduzem-se nos intestinos de humanos e animais de sangue quente, e normalmente, não são bem adaptadas ao ambiente aquático, onde a disponibilidade de nutrientes é bem menor (Hobbie, 1966; Gray, 1976; Morita, 1982).

A manutenção de bactérias sob limitação de nutrientes induz a síntese de proteínas específicas para esta condição e também permite que a bactéria sobreviva a outros tipos de estresse, como por exemplo, o estresse de temperatura, peroxidase (Jenkins *et al.*, 1988) e a aplicação de desinfetantes (Berg *et al.*, 1982; Harakeh *et al.*, 1985; Matin & Harakeh, 1990). Para *E. coli* O157:H7, por exemplo, o cultivo sob limitação de nutrientes exige que o tempo de contato

com cloro seja aumentado em até 6 vezes, em relação à amostras não-estressadas (Lisle *et al.*, 1998).

Além de aumentar a resistência das bactérias a uma série de fatores estressantes, as condições físicas e químicas da água podem provocar injúria, condição onde as características fisiológicas são alteradas, induzindo erros na avaliação da qualidade da água. Bactérias que sofreram injúria podem não ser detectadas por metodologias tradicionais (McFeters, 1990) ou a sua concentração na amostra pode ser subestimada devido a sua incapacidade de crescer em meio seletivo, onde células íntegras conseguem desenvolver-se (Bissonnette, 1974; McFeters, 1990). Os próprios desinfetantes utilizados no tratamento de água podem causar injúria na célula, quando a dose aplicada é sub-letal ou o tempo de exposição é reduzido para evitar a formação de trihalometanos (Camper & McFeters, 1979; McFeters & Camper, 1983).

Em condições adversas, como concentração reduzida de nutrientes, altas ou baixas temperaturas, variações na salinidade e pH, algumas espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas podem continuar viáveis, mas não cultiváveis em meio seletivo (Dukan *et al.*, 1997; Lleò *et al.*, 2001), dificultando a detecção de células neste estado por técnicas tradicionais (Lleò *et al.*, 2001). Existem controvérsias sobre a possibilidade destas bactérias recuperarem a patogenicidade e a capacidade de multiplicação (ressuscitarem). Foi observado que amostras não-cultiváveis de *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* recuperavam a patogenicidade após serem cultivadas em condições adequadas, enquanto amostras não-cultiváveis de *Salmonella enterica* conseguiam recuperar a viabilidade, mas não a patogenicidade (Kolling & Matthews, 2001). Amostras de *E. coli* O157:H7, que tornaram-se não cultiváveis quando submetidas a estresse por limitação de nutrientes ou por aplicação de cloro, não recuperaram a viabilidade e nem a patogenicidade quando cultivadas em meio suplementado com piruvato de sódio e catalase ou foram inoculadas em ratos (Kolling & Matthews, 2001).

Células no estado viável, mas não cultivável apresentam metabolismo ativo, respiração, membrana celular íntegra e transcrição de genes específicos (Lleò *et al.*, 2001), sugerindo que este estado não é apenas uma condição citológica, mas uma estratégia adaptativa regulada por genes, utilizada pela bactéria para sobreviver em situações inadequadas (Nyström, 2001).

Rockabrand *et al.* (1999) observaram que o tratamento da água com cloro reduzia em quase 100 vezes o número de colônias de *E. coli* formadas em meio seletivo m-Endo, em relação a amostras não tratadas. Porém, quando a amostra tratada foi colocada em meio específico para

recuperação das células, não foram detectadas diferenças no número de colônias formadas, em relação a amostra não tratada, indicando que a cloração não eliminou as bactérias, mas provocou alguma alteração que impedia seu crescimento em meio seletivo.

De modo geral, as injúrias sofridas por bactérias em ambientes aquáticos são causadas por desinfetantes ou outros agentes utilizados para eliminar microrganismos (Hoadley & Cheng, 1974; Camper & McFeters, 1979; McFeters & Camper, 1983). O cloro é o desinfetante mais utilizado e, desde 1935 há relatos sobre inativação de bactérias por este agente (Mudge & Smith, 1935). Camper & McFeters (1979) observaram que a concentração de cloro de 0,5 mg/L já é suficiente para induzir injúria e que o processo é dependente do tempo e da concentração de cloro usados. Outros fatores podem estar relacionados à injúria, como por exemplo, a presença de metais (Domek *et al.*, 1984), radiação ultra-violeta (Fujioka & Narikawa, 1982), redução de pH (Hackney & Bissonnette, 1980).

#### 4. Resposta a estresse em *Escherichia coli*

Por serem adaptadas às condições existentes no tubo digestivo de animais, para bactérias entéricas como a *Escherichia coli*, a permanência no ambiente é considerada uma situação estressante, devido às variações de pH, luminosidade e temperatura, à possível presença de poluentes, desinfetantes e antibióticos e à baixa disponibilidade de nutrientes (Espinosa-Urgel & Kolter, 1998; Solo-Grabriele *et al.*, 2000). Mesmo no organismo de seus hospedeiros, as enterobactérias são submetidas à condições estressantes, como variações na dieta, ingestão de medicamentos e oscilações no humor do hospedeiro que também podem provocar alterações no metabolismo da bactéria (Moro *et al.*, 2000).

Um grande número de genes relacionados a resposta ao estresse foi identificado em *E. coli*: *rpoH*, *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groEL* e *groES*, têm expressão relacionada ao choque térmico (*heat shock*) (Arsène *et al.*, 2000); a expressão de *htpG* é induzida por etanol, cádmio, cloretos e estresse de temperatura (Mason *et al.*, 1999); *oxyR*, *soxR*, *katG* e *katE* estão relacionados a estresse oxidativo (Pichereau *et al.*, 2000; Pomposiello *et al.*, 2001); *micF* é detectado em resposta a presença de compostos tóxicos, redução de nutrientes e estresse oxidativo (Delilhas & Forst, 2001); *rpoE* é induzido em resposta a choque térmico, estresse oxidativo, choque osmótico, presença de etanol e limitação de nutrientes (Hild *et al.*, 2000; Dartigalongue *et al.*, 2001) e *rpoS*

têm expressão relacionada a estresse de temperatura, salino e nutricional (Notley-McRobb *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 1999). A análise destes genes indicou que muitos deles não são expressos especificamente em resposta a uma condição, como por exemplo, os genes *heat shock*, induzidos em resposta ao choque térmico e à aplicação de substâncias tóxicas (Arsène *et al.*, 2000) e o gene *micF*, induzido sob estresse oxidativo e cuja expressão é regulada de acordo com a concentração de nutrientes (Delilhas & Forst, 2001).

A resposta ao choque térmico em *E. coli* envolve cerca de 20 proteínas *heat shock* (HSPs) que têm síntese aumentada imediatamente após a exposição ao estresse e são reprimidas tão logo a bactéria se adapte as novas condições (Arsène *et al.*, 2000). A resposta ao choque térmico é regulada principalmente pelo gene *rpoH*, que codifica a subunidade  $\sigma^{32}$  da RNA polimerase, necessária para que a enzima reconheça os promotores dos genes que codificam as proteínas *heat shock* (Arsène *et al.*, 2000). As principais HSPs conhecidas são as chaperoninas DnaK, GroEL, GroES, DnaJ e GrpE (Arsène *et al.*, 2000), responsáveis pela manutenção ou restauração da estrutura de proteínas existentes na célula e estabilização de sítios de ligação destas proteínas, impedindo a formação de agregados (Bukau & Horwich, 1998). As HSPs receberam esta denominação por terem sido identificadas sob condições de estresse, onde sua síntese é aumentada em até 15 vezes, porém, as HSPs também são expressas em células mantidas em condições ideais de cultivo, onde são responsáveis pela estruturação de proteínas recém-sintetizadas e auxiliam a degradação de proteínas instáveis (Bukau & Horwich, 1998; Arsène *et al.*, 2000; Grimshaw *et al.*, 2001).

Em *E. coli*, o estresse oxidativo induz a transcrição de vários genes que estão relacionados a funções anti-oxidantes (*katG* e *katE*) (Potter *et al.*, 2000), genes que controlam a permeabilidade da membrana celular (*micF*) (Delilhas & Forst, 2001; Pomposiello *et al.*, 2001) e genes relacionados ao reparo de enzimas (*fumC*) e de DNA (*nfo* e *fpr*) (Pomposiello *et al.*, 2001). Os genes *soxR* e *oxyR* codificam as proteínas SoxR e OxyR, que são os principais reguladores da resposta de *E. coli* ao estresse oxidativo, embora também sejam expressos em condições fisiológicas (Potter *et al.*, 2000; Pomposiello *et al.*, 2001). Uma situação onde ocorre indução de genes relacionados ao estresse oxidativo é a fagocitose de *E. coli* por macrófagos. Esta resposta é induzida pela presença de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio de modo que, bactérias capazes de responder a esse estresse conseguem sobreviver a este mecanismo de defesa do hospedeiro (Delilhas & Forst, 2001; Potter *et al.*, 2000).

O gene *micF* codifica um RNA antisense, cuja principal função é controlar a permeabilidade da membrana celular, inibindo a tradução do gene *ompF*, responsável pela formação de poros para o transporte passivo de moléculas hidrofílicas (Delilhas & Forst, 2001). A transcrição do gene *micF* é induzida por estresse oxidativo, aplicação de antibióticos, presença de ácidos fracos e em ambientes com alta concentração de nutrientes (Delilhas & Forst, 2001; Pomposiello *et al.*, 2001). Os fenótipos associados a expressão de *micF*, incluem o aumento da resistência da bactéria a fagocitose por macrófagos, aumento da resistência múltipla a antibióticos e perda da motilidade, devido a inibição de proteínas que constituem os flagelos (Inoue *et al.*, 1997).

Os genes *rpoS* e *rpoE* são responsáveis pela síntese de fatores sigma, ou seja, são importantes para o direcionamento da RNA polimerase a promotores específicos (Arsène *et al.*, 2000). O gene *rpoS* codifica a proteína RpoS, que regula a síntese da catalase KatE em resposta ao estresse oxidativo (Potter *et al.*, 2000). A RpoS também é bastante expressa em *E. coli* O157:H7 e está relacionada a alta resistência desta bactéria a ambientes ácidos, altas concentrações de sal e altas temperaturas (Jordan *et al.*, 1999), permitindo a sua sobrevivência em alimentos ácidos como salsichas (Cheville *et al.*, 1996), maionese (Weagant *et al.*, 1994), iogurte (Morgan *et al.*, 1993) e carnes mal cozidas (Wall *et al.*, 1996). O gene *rpoE* codifica o fator  $\sigma^E$ , responsável pela regulação de genes, cujos produtos estão relacionados a estruturação de proteínas, mesmo em condições fisiológicas (Dartigalongue *et al.*, 2001). O fator  $\sigma^E$  também regula a síntese de proteínas relacionadas a síntese de lipopolissacarídeos que compõem a membrana externa e a remoção e inserção de polipeptídeos que compõem a bicamada lipídica da membrana celular (Dartigalongue *et al.*, 2001).

O gene *hspG*, que codifica a proteína *heat shock* HtpG, é induzido sob outras condições de estresse além do choque térmico, como por exemplo, o tratamento com etanol, cádmio e cloretos (Mason *et al.*, 1999). A proteína HtpG atua como uma chaperonina, ligando-se a proteínas parcialmente desnaturadas e facilitando a sua reativação (Thomas & Baneyx, 1998). A síntese de HtpG é bastante influenciada pelas condições de cultivo anteriores a aplicação do estresse. A síntese de HtpG foi observada em amostras que foram cultivadas em meio de cultura complexo antes de sofrerem variação de temperatura de 37°C para 45°C, mas o mesmo não ocorreu em amostras que passaram pelo mesmo tratamento, mas foram previamente cultivadas em meio de cultura mínimo (Mason *et al.*, 1999). São conhecidos algumas situações onde ocorre aumento da

resistência de bactérias a algumas condições estressantes quando as amostras são previamente cultivadas sob redução da concentração de nutrientes (Rowe & Kirk, 2000). Em *Enterococcus faecalis* observou-se a diminuição da sensibilidade a vários fatores de estresse como calor, etanol, ácidos, agentes oxidantes, hipoclorito de sódio e à radiação ultra-violeta em amostras cultivadas sob limitação de glicose (Pichereau *et al.*, 2000). Esta situação, onde um organismo é submetido a uma situação de estresse não-letal e a seguir é submetido a um outro tipo de estresse e apresenta maior resistência a essa condição que a população não-estressada original, é chamada de proteção cruzada (Rowe & Kirk, 2000) e também foi observada em outros organismos como *E. coli* (Hengge-Aronis, 1996), *Salmonella enterica Typhimurium* (O'Neal *et al.*, 1994), *Bacillus subtilis* (Hecker & Volker, 1998), *Staphylococcus aureus* (Kullik *et al.*, 1998) e *Listeria monocytogenes* (Wiedmann *et al.*, 1998).

## 5. A bacia do rio Cotia

Alguns experimentos deste projeto visaram a detecção de genes expressos diferencialmente em amostras de *E. coli* cultivadas em água de rio e em amostras tratadas com cloro após um período de cultivo em água. Para a realização destes experimentos, decidiu-se pela coleta de água no rio Cotia, no município de Carapicuíba, S.P.

O rio Cotia foi escolhido por atravessar uma região altamente urbanizada, com aproximadamente 400 indústrias e receber efluentes domésticos e industriais, além de integrar o sistema de abastecimento de água da Região Metropolitana de São Paulo (CETESB, 2001). A coleta de água para cultivo das amostras de *E. coli* foi realizada no canal de captação de água da estação de tratamento de água do Baixo Cotia, pertencente à SABESP (figura 1). Neste mesmo local, existe uma estação de monitoramento automático da CETESB, responsável pela geração dos dados sobre a qualidade da água (CETESB, 2001).

Análises realizadas pela CETESB indicaram a contaminação do rio Cotia por fenóis e metais pesados, indicando a ocorrência de despejos industriais (CETESB, 2001). Fenóis são compostos tóxicos para os organismos aquáticos e provocam alteração do odor e sabor da água. Em humanos, a intoxicação por fenóis causa náuseas, vômitos, dores na cavidade bucal, na garganta e no estômago. Também provoca queda na pressão arterial, seguida do desenvolvimento de coma, convulsão e endemia dos pulmões (CETESB, 1999).

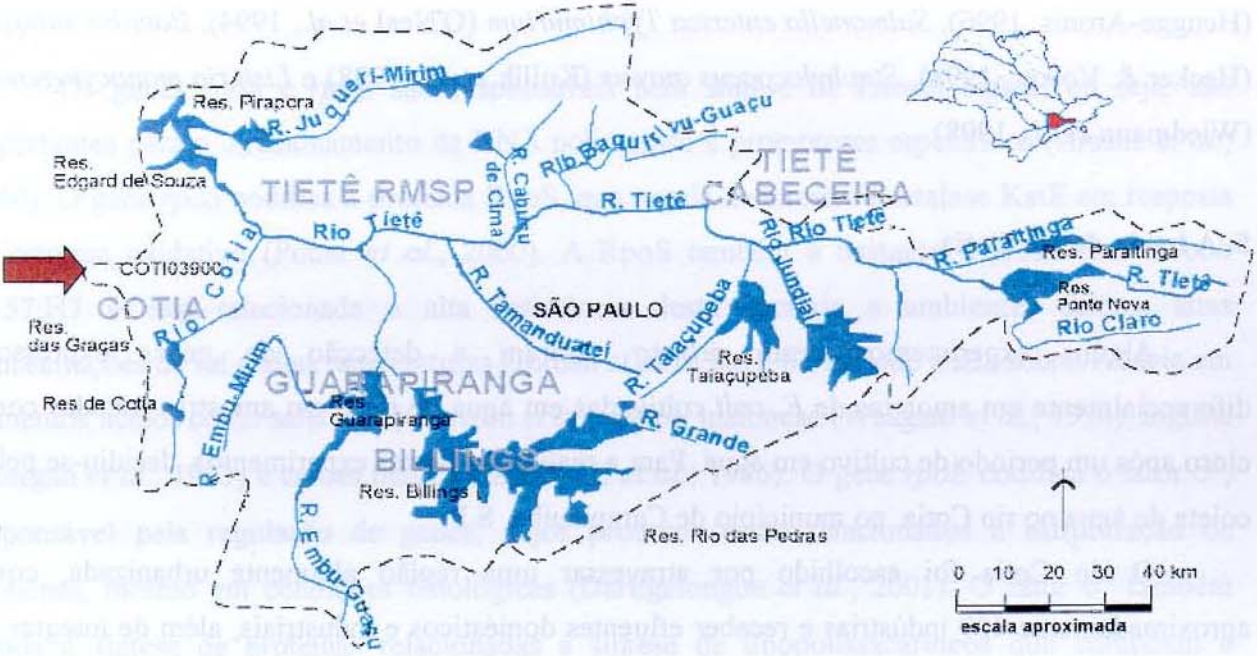


Figura 1: Mapa da Região Metropolitana de São Paulo. A seta indica a localização da estação de tratamento de água do Baixo Cotia, pertencente à SABESP. Esta figura foi obtida no *site*: [www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br).

Metais como cádmio, bário, chumbo, cobre, níquel, cromo, mercúrio e zinco são encontrados normalmente em água doce, porém, em altas concentrações prejudicam os sistemas nervoso, cardiovascular e gastrointestinal de humanos. O cádmio é liberado para o ambiente através da queima de combustíveis, uso de equipamentos eletrônicos e acessórios fotográficos. O bário é utilizado na fabricação de fogos de artifício, vidros e praguicidas. A liberação de chumbo é decorrente das atividades metalúrgicas e produção de plásticos e tintas. As maiores fontes de contaminação por cobre são a corrosão de tubulações por águas ácidas, fungicidas, indústrias de mineração, fundição e refinação. O cromo é liberado na produção de alumínio, aço inoxidável, tintas, explosivos, papel e fotografia. A queima de combustíveis fósseis é a principal causa da contaminação por níquel, mas a mineração também tem papel importante. A liberação de mercúrio é decorrente da fabricação de produtos odontológicos e farmacêuticos e processos de mineração e fundição. Já o zinco entra no meio ambiente através de esgotos domésticos, produção de ferro e aço e combustão de madeira (CETESB, 1999).

No ano de 2000, análises realizadas pela CETESB indicaram que na região que inclui o ponto COTI03900 (onde foi realizada a coleta de água para experimentos) houve piora na qualidade da água. Foi detectada alta concentração de chumbo, níveis elevados de contaminação por *Giardia* sp, coliformes, estreptococos fecais e *Clostridium perfringens* (CETESB, 2001). Também foi observado alto potencial de formação de trihalometanos nas captações das estações de tratamento de água do Baixo Cotia e do Alto Cotia.

Em 2 coletas (de um total de 6 realizadas em um ano), através do teste de Ames foi detectada atividade mutagênica em amostras de água do ponto COTI03900, tornando necessária a investigação da origem de poluição (CETESB, 2001).

Até o momento, não são conhecidos trabalhos que avaliem a expressão diferencial de genes em amostras de bactérias entéricas estressadas pela permanência em ambientes poluídos. A identificação de genes relacionados a resposta ao tratamento com cloro em amostras cultivadas em condições ideais e neste tipo de ambiente pode, a longo prazo, permitir a melhor compreensão das alterações sofridas por bactérias entéricas em resposta ao processo de tratamento de água para consumo humano, assim como o desenvolvimento de metodologias para detecção de contaminação fecal em água.

## **OBJETIVOS**

**Objetivo geral**

Analisar a expressão gênica diferencial em células de *Escherichia coli* mantidas em laboratório e em água do rio Cotia (Carapicuíba – S.P.), quando submetidas ao tratamento com cloro.

**Objetivos específicos**

1. Analisar o efeito de diferentes concentrações de cloro e de diferentes tempos de exposição a este agente, sobre as linhagens ATCC 25922 e 4219 de *E. coli*, cultivadas em meio LB, através da construção de curvas de sobrevivência;
2. Analisar, utilizando-se curvas de sobrevivência, o efeito de diferentes concentrações de cloro e de diferentes tempos de exposição a este agente, sobre as linhagens ATCC 25922 e 4219 mantidas em água do rio Cotia;
3. Identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente na presença de cloro em células mantidas em condições de laboratório e células mantidas em água do rio Cotia, através da técnica de RAP-PCR;
4. Confirmação da expressão gênica diferencial, através de *slot blot*;
5. Clonagem e sequenciamento dos fragmentos diferenciais;
6. Comparação das seqüências em bancos de dados.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **1. Linhagens de *Escherichia coli***

Foram utilizadas nos experimentos, a linhagem de coleção *Escherichia coli* ATCC 25922 e a linhagem 4219, obtida pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) em coleta realizada na represa Billings (São Paulo – S. P.) em 20 de outubro de 1999. A linhagem de *E. coli* 4219 foi isolada a partir de caldo EC positivo, plaqueado em ágar eosina azul de metileno (EAM) e as colônias típicas foram triadas em meio IAL (Instituto Adolfo Lutz), ágar citrato de Simmon's, caldo lactosado, reação de oxidase e coloração de Gram.

## **2. Preparo de cultura permanente das linhagens**

As linhagens de *E. coli* foram enviadas pela CETESB em meio LB sólido. Estas linhagens foram inoculadas em meio LB líquido (Bacto triptona, 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5) (Sambrook *et al.*, 1989) e incubadas a 37°C, durante a noite, sob agitação de 250 rpm. Após o crescimento, aproximadamente 10 µL de cada uma das culturas foram distribuídos separadamente em placa de Petri contendo meio LB sólido (LB líquido contendo 15 g/L de Bacto ágar) (Sambrook *et al.* 1989) e incubadas a 37°C durante a noite. Uma colônia isolada foi escolhida de cada uma das placas e inoculada em 2 mL de meio LB líquido. A partir deste material foram preparadas culturas permanentes para estas linhagens. Para isto, 750 µL de cada cultura foram misturados com 250 µL de glicerol estéril. As culturas permanentes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C.

## **3. Crescimento e sobrevivência na presença de cloro**

As linhagens de *E. coli* ATCC 25922 e 4219 foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas à 37°C, 250 rpm (condições ideais para o crescimento da cultura) para a realização de uma curva de crescimento. Aliquotas dos inóculos foram retiradas em intervalos de 1 hora. Estas aliquotas foram diluídas serialmente, plaqueadas em meio LB sólido e incubadas à 37°C durante à noite. O número de colônias formadas foi contado e a partir destes dados foram construídas as

curvas de crescimento. Com base nestes dados, foi decidido que a incubação das linhagens por 4 horas seria ideal para a obtenção de células destinadas aos experimentos seguintes.

Para os experimentos com cloro, 20 mL de cada uma das linhagens cultivadas à 37°C, 250 rpm por 4 horas foram sedimentados por centrifugação a 11000 rpm por um minuto em microcentrífuga (Beckman), lavadas três vezes e ressuspensas em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5 (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando-se o mesmo volume da cultura inicial.

Para verificar a sobrevivência das linhagens na presença de cloro, foram acrescentados 10 mg/L do desinfetante, na forma de hipoclorito de sódio. As amostras foram incubadas a 37°C, sob agitação de 160 rpm. Foram realizadas duas curvas de sobrevivência. A primeira foi feita com alíquotas das linhagens coletadas após 0, 10, 20 e 30 minutos de exposição e a segunda, após 0, 5, 10 e 15 minutos. Assim que as alíquotas eram retiradas, o cloro foi inativado com a adição de tiosulfato de sódio na concentração final de 0,02% (Saby *et al.*, 1999).

As alíquotas retiradas durante os experimentos foram diluídas serialmente em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, plaqueadas em meio LB sólido e incubadas a 37°C durante a noite. A sobrevivência foi avaliada a partir da contagem de UFC (unidade formadora de colônia) dos controles (amostras cultivadas à 37°C, 250 rpm por 4 horas) e das amostras tratadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### **4. Efeito do cloro nas linhagens de *E. coli* após permanência nas águas do rio Cotia**

As linhagens de *E. coli* ATCC 25922 e 4219 foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas a 37°C, 250 rpm por 4 horas. As culturas foram submetidas a centrifugação à 11000 rpm por 1 minuto e o meio de cultivo foi descartado. A seguir, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato 50 mM pH 7,5 estéril e colocadas em câmaras de McFeters (figura 2) (McFeters & Stuart, 1972). As câmaras foram colocadas em um béquer de vidro com capacidade de 5 litros, contendo água do rio Cotia coletada pela CETESB. Amostras de 1 mL foram retiradas das câmaras a cada 24 h por 3 dias, e após diluições seriais em tampão fosfato foram construídas curvas de sobrevivência. Durante a realização do tratamento a água foi mantida à temperatura ambiente (25°C) e o pH verificado no início e no final do período de cultivo foi aproximadamente 7,0.

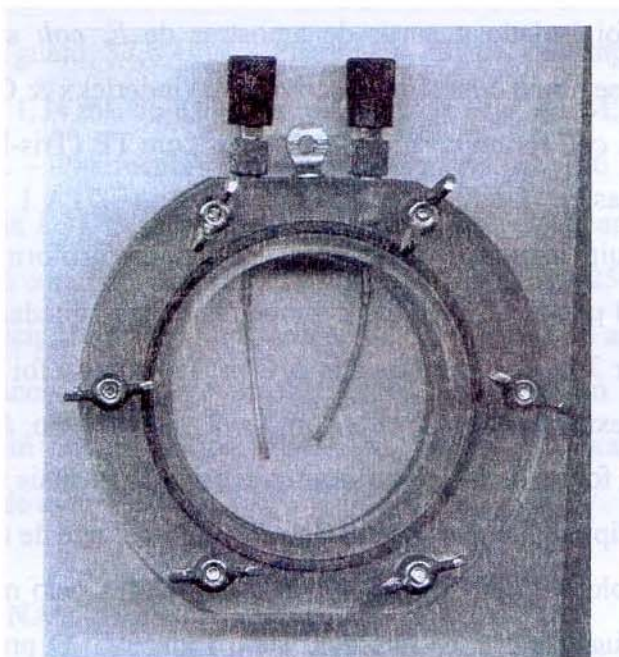


Figura 2. Câmara de McFeters. Esta câmara é feita em acrílico e na hora do uso deve ser revestida com membrana semi-permeável, o que permite o contato das amostras com a água e impede a contaminação com microrganismos presentes no ambiente.

A partir destes resultados, foi definido que as amostras seriam mantidas em água do rio por 12 horas para os experimentos com cloro e extração de RNA. Após este período, as células foram retiradas das câmaras, sedimentadas através de centrifugação a 11000 rpm, 1 minuto em uma microcentrifuga (Beckman), lavadas por duas vezes e ressuspensas em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5. A seguir, foram realizados tratamentos com cloro e curvas de sobrevivência como descrito no item 3.

## 5. Isolamento de RNA

O RNA total foi isolado a partir de amostras de *E. coli* submetidas a cada um dos tratamentos propostos, segundo o método descrito por Winderickx & Castro (1994).

As células de *E. coli* foram lavadas por 3 vezes com TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) e ressuspensas em 1 mL de tampão de extração (EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M; pH 7,5). A seguir, foi acrescentado 1 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25v: 24v: 1v), contendo 100 µL de SDS 10%. As amostras foram agitadas por 2 minutos em vortex. Após centrifugação por 3 minutos, 9000 rpm, 6°C, a fase aquosa foi transferida para outro tubo eppendorf e uma nova extração foi realizada com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25v: 24v: 1v). Este procedimento foi repetido até que a interface não fosse mais visível.

O RNA foi precipitado através da adição de  $\frac{1}{20}$  do volume de acetato de potássio 40% e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA foi mantido a -70°C por pelo menos 2 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 9000 rpm, 6°C. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e depois de seco, foi ressuspendido em aproximadamente 20 µL de água-DEPC (dietil pirocarbonato) e estocado a -70°C.

As amostras foram quantificadas em gel de 1% de agarose, 6% de formaldeído em tampão MOPS 1x (Tampão MOPS 10x: 41,8 g de MOPS; 16,6 mL de acetato de sódio 3 M, 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; água q.s.p. 1000 mL; pH 7,0).

Estes RNAs foram utilizados nos experimentos de RAP-PCR e na síntese de sondas para as hibridizações das membranas de *slot blot*.

## 6. RAP-PCR

O RAP-PCR (*RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction*) foi realizado segundo metodologia descrita por Welsh *et al.* (1992) e Wong & McClelland (1994).

### 6.1. Tratamento do RNA com DNase

As amostras de RNA foram tratadas com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA. Para isto foi utilizado 1 µg de RNA, ao qual acrescentou-se 0,5 µL de inibidor de RNase (RNA guard, 37,8 U/µL - Pharmacia), 24 µL de tampão para DNase (0,8 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,3; 1,34 mL de KCl 3 M; 0,12 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M; H<sub>2</sub>O q.s.p. 24 mL) e 1,6 µL de DNase (10 U/µL – Pharmacia) em um volume final de 106 µL. As amostras foram incubadas em banho-maria à 37°C por 1 hora. A seguir, foram acrescentados 100 µL de água e foi realizada uma extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25v: 24v: 1v) para remover a DNase. O RNA foi precipitado através da adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto e incubação a -20°C por no mínimo 2 horas. Após centrifugação e lavagem com etanol 70%, as amostras foram ressuspensas em aproximadamente 20 µL de água-DEPC.

### 6.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *RT-PCR Beads* (Amersham Pharmacia), seguindo as instruções do fabricante. Para cada reação, foram utilizados 10 µM de um dos *primers* arbitrários J04 (5'-CCGAACACGG-3'), J12 (5'-GTCCCGTGGT-3'), J14 (5'-CACCCGGATC-3') e J15 (5'-TGTAGCAGGG-3') (OPERON *Technologies*), 1 µg de RNA tratado com DNase e água-DEPC para completar o volume final da reação (50 µL). As reações foram incubadas a 42°C por 30 minutos e logo a seguir, a transcriptase reversa foi inativada a 95°C por 5 minutos.

### 6.3. PCR a partir do cDNA e eletroforese das amostras amplificadas

A amplificação das amostras foi feita utilizando-se 4  $\mu$ L do cDNA; 10  $\mu$ L de tampão contendo Tris-HCl 2 mM, pH 8,3; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 4 mM; *primer* arbitrário 1  $\mu$ M; dNTP 2  $\mu$ M; [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP 1  $\mu$ Ci; *Taq* polimerase 1,25 U, em um volume final de 20  $\mu$ L. As condições de amplificação foram: desnaturação à 94°C (5 minutos), seguido de 40 ciclos de 94°C (30 segundos), 40°C (2 minutos) e 72°C (30 segundos). A extensão final foi realizada a 72°C por 20 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel desnaturante de acrilamida (6%). Para isto, 7  $\mu$ L do produto de cada reação de PCR foram misturados com 5  $\mu$ L do tampão: formamida deionizada 88% (v/v); EDTA 10 mM pH 8,0; xileno cianol 0,01% e azul de bromofenol 0,01%. As amostras foram desnaturadas a 80°C por 4 minutos e 10  $\mu$ L foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada à 1320 V, 35 mA, 27 W. O término da corrida se deu 30 minutos após a frente de xileno-cianol chegar ao final do gel. Após o processo de eletroforese, o gel foi seco à vácuo sobre uma folha de papel Whatman 3 MM e o padrão de bandas foi visualizado através de exposição a filme de raio x.

### 7. Isolamento e reamplificação dos fragmentos diferenciais

Os fragmentos diferenciais obtidos em cada tratamento representam a expressão diferencial dos genes ativados ou reprimidos pelas células em resposta as condições de cultivo. Para o isolamento destes fragmentos, o gel foi alinhado com a autorradiografia e as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram cortadas do gel e colocadas em tubo eppendorf. O DNA foi eluído através de incubação por 15 minutos a 95°C em 200  $\mu$ L de água e precipitado através da adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. O DNA foi mantido à -20°C durante a noite, centrifugado e ressuspendido em 10  $\mu$ L de água. Quatro  $\mu$ L do DNA eluído foi reamplificado em uma reação com volume final de 40  $\mu$ L contendo: Tris-HCl 2 mM, pH 8,3; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 4 mM; *primer* arbitrário 1  $\mu$ M; dNTP 20 mM; *Taq* polimerase 2,5 U. A amplificação foi realizada através de desnaturação a 94°C, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 40°C por 2 minutos, 72°C por 30 segundos e extensão final à 72°C por 20 minutos. As amostras reamplificadas foram quantificadas através de

eletroforese em gel de 2% de agarose em tampão TAE 1x, utilizando-se o padrão de massa e peso molecular  $\phi\chi 174$ -Hae III (GibcoBRL). As amostras que apresentaram contaminação foram submetidas a nova eletroforese nas condições citadas acima e as bandas que apresentaram tamanho esperado foram cortadas do gel e purificadas utilizando-se o kit *Concert Rapid Gel Extraction System* (GibcoBRL).

## 8. Slot blot

A confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados foi realizada por *slot blot* (Xu *et al.*, 1997; Mou *et al.*, 1994). Para isto, uma membrana Hybond (Amersham) foi umedecida com SSC 10x (obtido a partir de uma solução SSC 20x: NaCl 3 M e citrato de sódio 0,3 M) e colocada no *slot blot*, conectado a uma bomba de vácuo. Dez ng de DNA, obtido a partir da reamplificação dos fragmentos diferenciais isolados do gel de RAP-PCR, foram colocados em tubo eppendorf e o volume das amostras foi completado para 200  $\mu$ L com TE. A desnaturação das amostras foi feita por 10 minutos à 95-100°C. A seguir, foi acrescentado volume igual de SSC 20x. As amostras foram colocadas nos *slots* e transferidas para a membrana. Após a passagem de todas as amostras, os *slots* foram lavados com 500  $\mu$ L de SSC 10x. A membrana foi seca a temperatura ambiente e o DNA foi fixado à 80° C por 2 horas. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

## 9. Hibridização das membranas de slot blot

Para a hibridização das membranas obtidas nos experimentos de *slot blot* foram utilizados como sondas, os cDNAs obtidos a partir do RNA extraído em cada tratamento. Estes experimentos foram realizados em duplicata.

Os cDNAs foram reamplificados e, a seguir, quantificados em gel de agarose 2%, utilizando o padrão de massa e peso molecular  $\phi\chi 174$ -Hae III (GibcoBRL). Aproximadamente 30 ng destes cDNAs foram marcados radioativamente com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP utilizando-se o kit *Megaprime* (Amersham Pharmacia).

As membranas foram pré-hibridizadas por 5 horas a 42°C em solução composta por formamida deionizada 50% (v/v); SSC 5x; Denhardt's 10x (PVP 0,2%; ficoll 0,2%; BSA 0,2%); Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); SDS 1%; DNA de esperma de salmão 100 µg/mL.

A hibridização foi feita utilizando-se tampão contendo formamida deionizada 50% (v/v); SSC 5x; Denhardt's 2x; Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); SDS 1%; sulfato de dextran 5%; DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/mL;  $10^7$ – $10^8$  cpm/mL de sonda previamente desnaturada a 100°C por 5 minutos. As membranas foram incubadas à 42°C, durante a noite.

Após a hibridização as membranas foram lavadas 2 vezes com solução contendo SSC 2x e SDS 0,1%, por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas em SSC 0,1x e SDS 0,1% a 55°C, pelo tempo necessário para o decréscimo da radioatividade, monitorando-se com contador Geiger. Após as lavagens, as membranas foram expostas a filme de raio-x para visualização dos resultados.

#### **10. Análise dos sinais de hibridização dos experimentos de *slot blot***

Os sinais de hibridização obtidos foram digitalizados e quantificados utilizando-se o programa *Kodak digital science 1D* v. 2.0.3 e as médias obtidas para cada fragmento foram normalizadas como o descrito por Gill *et al.* (1999), com modificações. Diferenças de intensidade e diferenças na presença/ausência de bandas dos diferentes tratamentos caracterizaram os fragmentos que tiveram expressão diferencial confirmada.

A partir dos dados normalizados de amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, foi construído um gráfico de dispersão, onde os pontos localizados sobre uma reta de função  $x=y$  representam fragmentos que não tiveram expressão diferencial confirmada e, pontos mais distantes da reta normal representam fragmentos que tiveram maior grau de indução ou repressão nas condições estudadas. A mesma análise foi realizada utilizando-se dados normalizados de amostras mantidas em água do rio Cotia e tratadas com cloro após este período de manutenção.

A razão entre os valores normalizados obtidos na hibridização com sondas de amostras tratadas com cloro e amostras cultivadas em LB determinaram os coeficientes de expressão para cada fragmento isolado em um destes tratamentos. Da mesma forma, os coeficientes de expressão dos fragmentos isolados de amostras tratadas com cloro após manutenção em água e amostras mantidas em água foram calculados.

Os fragmentos analisados por *slot blot* foram hibridizados com sondas obtidas dos 4 tratamentos experimentais, deste modo, além de confirmar a expressão diferencial dos fragmentos isolados dos géis de RAP-PCR, foi possível analisar seus padrões de expressão nas 4 condições estudadas. Para isto, os valores das quantificações destas hibridizações foram normalizados com descrito por Gill *et al.* (1999) e a expressão em cada condição foi comparada com o auxílio do programa *Gene Cluster* v.1,1, *Cluster* v. 2.11 e *TreeView* v. 1,45 (<http://rana.stanford.edu/software>).

## 11. Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos diferenciais

Para a etapa de clonagem e seqüenciamento foram selecionados 20 fragmentos (10 obtidos de experimentos com a linhagem ATCC 25922 e 10 obtidos da linhagem 4219) que apresentaram coeficientes de expressão maior ou aproximadamente igual a 2, ou seja, eram mais expressos em amostras tratadas com cloro após cultivo em meio LB ou em água do rio Cotia. Estes fragmentos foram clonados utilizando-se o kit *pGEM-T Easy* (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante e seqüenciados em um seqüenciador automático (ABI PRISM 377, Perkin Elmer). Cerca de 3 clones de cada fragmento foram seqüenciados, sendo que dois clones foram seqüenciados utilizando-se o *primer* direto e um clone com o *primer* reverso.

As seqüências de nucleotídeos obtidas dos clones de um mesmo cDNA foram alinhadas com auxílio do programa Clustal W (v. 1,75). A seguir, as seqüências foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados, utilizando-se o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>), função BLASTX 2.2.1 (Altschul *et al.*, 1997).

## 12. Técnicas padrões de biologia molecular

Técnicas padrões de biologia molecular como eletroforese de DNA, RNA e outras foram realizadas como descrito em Sambrook *et al.* (1989).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 1. Sobrevivência das linhagens ATCC 25922 e 4219 na presença de estresse

Foram realizadas curvas de crescimento das linhagens ATCC 25922 e 4219, em meio LB, à 37°C e 250 rpm (condições ideais para a manutenção da cultura). Os resultados indicaram que 4 horas é o período ideal de incubação das amostras para a realização dos experimentos com cloro e em água do rio Cotia (figura 3). Após este período, as culturas apresentaram concentração de aproximadamente  $10^8$  células/mL, que pode ser considerada suficiente para a realização dos demais experimentos (Dukan *et al.*, 1997; Saby *et al.*, 1997).

Após 4 horas de incubação em meio LB, amostras das linhagens ATCC 25922 e 4219 foram submetidas ao tratamento com cloro. Em concentrações baixas, como 1 mg/L e 2 mg/L não foram observadas alterações no número de UFC (unidades formadoras de colônia) com o decorrer do tempo. Camper & McFeters (1979) observaram indução de injúria quando células de *E. coli* eram submetidas a baixas concentrações de cloro, como 0,5 mg/L. Considerando que a principal característica de bactérias que sofreram injúria é a sua incapacidade de crescer em meio seletivo (McFeters, 1990), é possível que o tratamento das linhagens ATCC 25922 e 4219 com 1 mg/L e 2 mg/L de cloro tenha provocado injúria nas células, e que este processo não tenha sido detectado devido a utilização de LB sólido (não seletivo) para plaquear as amostras.

Em estações de tratamento, a concentração de cloro utilizada varia de acordo com a qualidade da água captada. Dependendo do grau de contaminação com coliformes fecais, são utilizadas concentrações de 8-10 mg/L de cloro, mas em algumas situações, pode ser necessário a utilização de até 100 mg/L (comunicação pessoal – Eng. Alberto Ferro, SABESP).

A utilização de 10 mg/L de cloro causou redução no número de colônias formadas nas duas linhagens (figura 4). Após 5 minutos de exposição ao desinfetante, 75% da população da linhagem ATCC 25922 havia sido eliminada e após este período inicial, a porcentagem de células viáveis continuou sendo reduzida. A população da linhagem 4219 também sofreu uma redução drástica nos 5 primeiros minutos de exposição ao cloro (cerca de 50%), mas após este período, porcentagem de células viáveis se estabilizou e aparentemente, a amostra não foi mais afetada. Após a análise dos padrões de sobrevivência, a concentração de 10 mg/L de cloro foi escolhida para a realização do tratamento das amostras após cultivo em LB e manutenção em água do rio Cotia.

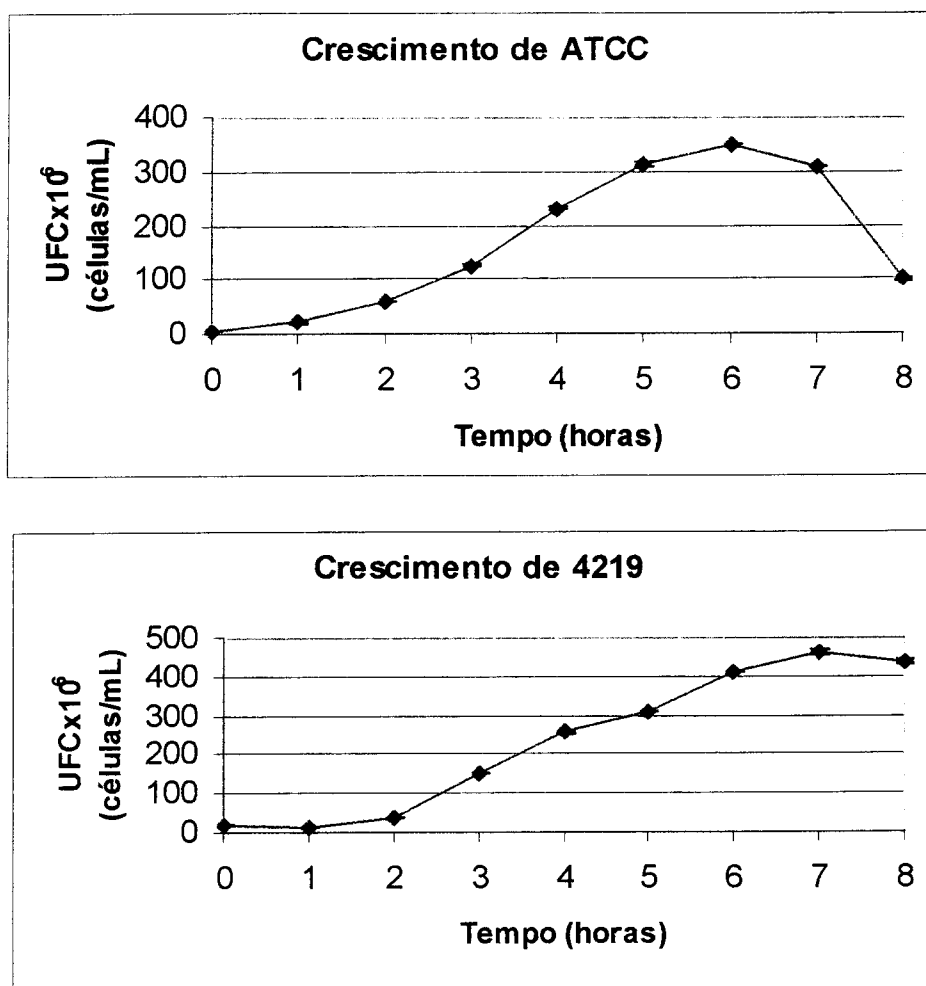


Figura 3: Curvas de crescimento das linhagens ATCC 25922 e 4219, mantidas à 37°C, 250 rpm, em meio LB. Estas foram as condições de obtenção dos controles utilizados nos demais experimentos.

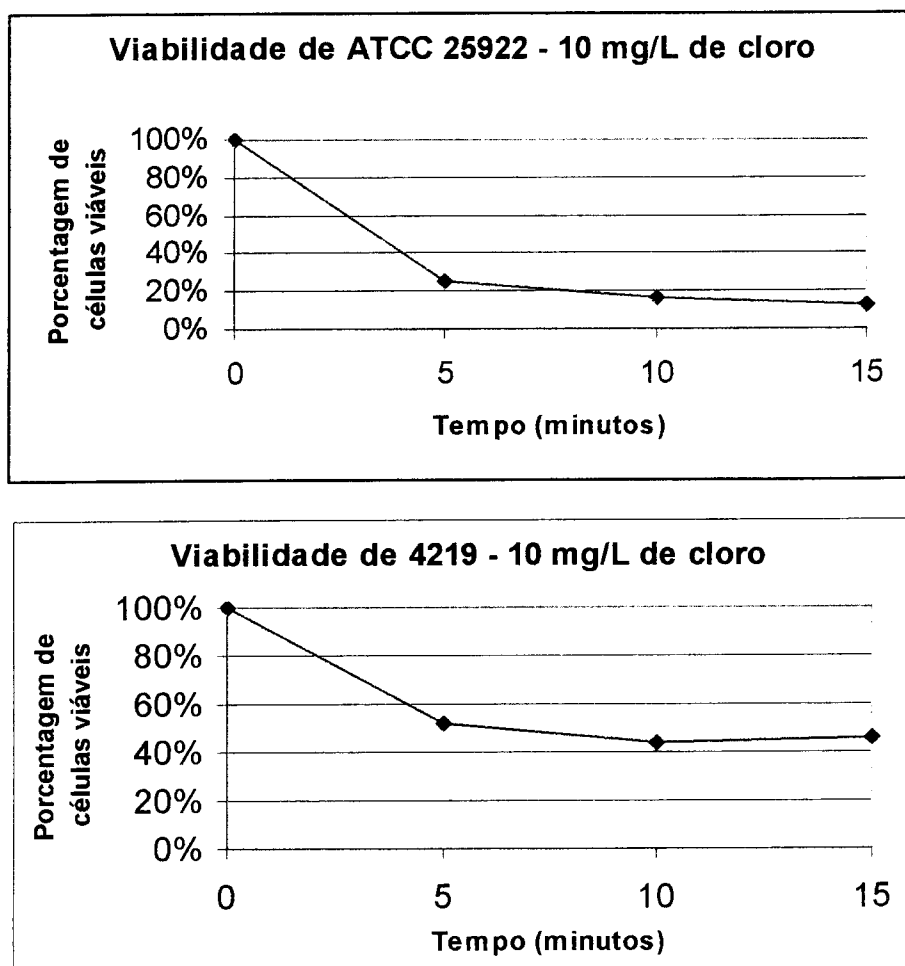


Figura 4: Sobrevivência das linhagens ATCC 25922 e 4219 ao serem tratadas com 10 mg/L de cloro.

O tratamento das linhagens com esta concentração de cloro por 5 minutos inviabilizou a extração de RNA, provavelmente, devido a alta taxa de mortalidade das células, por isso, optou-se pelo tratamento com o desinfetante por 2,5 minutos. Curvas de sobrevivência das amostras em tampão fosfato mostraram que a diminuição do número de UFC foi causada pela ação do cloro e não por algum componente do próprio tampão (figura 5).

As linhagens ATCC 25922 e 4219 mostraram perfis distintos de sobrevivência quando mantidas em água do rio Cotia (figura 6). Após 1 dia, a população da linhagem ATCC 25922 foi reduzida em 43%, enquanto a da linhagem 4219 foi reduzida em 18%. Em 2 dias, a linhagem ATCC 25922 apresentava redução de 58% e a linhagem 4219, de 64% em relação a população inicial. Já no final do experimento (3 dias), a linhagem ATCC apresentava 11% da população inicial e a 4219 apresentava 14%.

É possível observar que a linhagem ATCC 25922 sofreu redução acentuada de sua população logo nas primeiras horas de exposição ao estresse. Já a linhagem 4219, embora também apresentado redução acentuada de sua população ao término do experimento, aparentemente, não sofreu tão severamente quanto a linhagem ATCC 25922 os efeitos do estresse até o segundo dia. Este comportamento sugere que a linhagem 4219 possui estratégias distintas das apresentadas pela linhagem ATCC 25922 para responder a esta condição.

Considerando os resultados descritos acima, principalmente sobre a linhagem ATCC 25922, decidiu-se pela manutenção das linhagens em água por 12 horas para extração de RNA e experimentos com cloro. Este período foi considerado adequado porque mostrou-se suficiente para induzir resposta ao estresse e não comprometeu a integridade do RNA extraído. Foram realizadas curvas de sobrevivência das linhagens no leito do rio Cotia, mas os perfis obtidos não eram diferentes das curvas realizadas em laboratório com amostras de água recém coletada. Como o período de manutenção das amostras para os demais experimentos era curto, optou-se pela realização dos tratamentos em laboratório.

Foram construídas curvas de sobrevivência para as duas linhagens após manutenção em água do rio e tratamento com 10 mg/L de cloro (figura 7). Após 5 minutos, a porcentagem de células viáveis nas duas linhagens foi reduzido. Foi observado que amostras tratadas com a mesma concentração de cloro, mas que haviam sido mantidas em meio LB apresentavam menor sensibilidade ao desinfetante (figura 4).

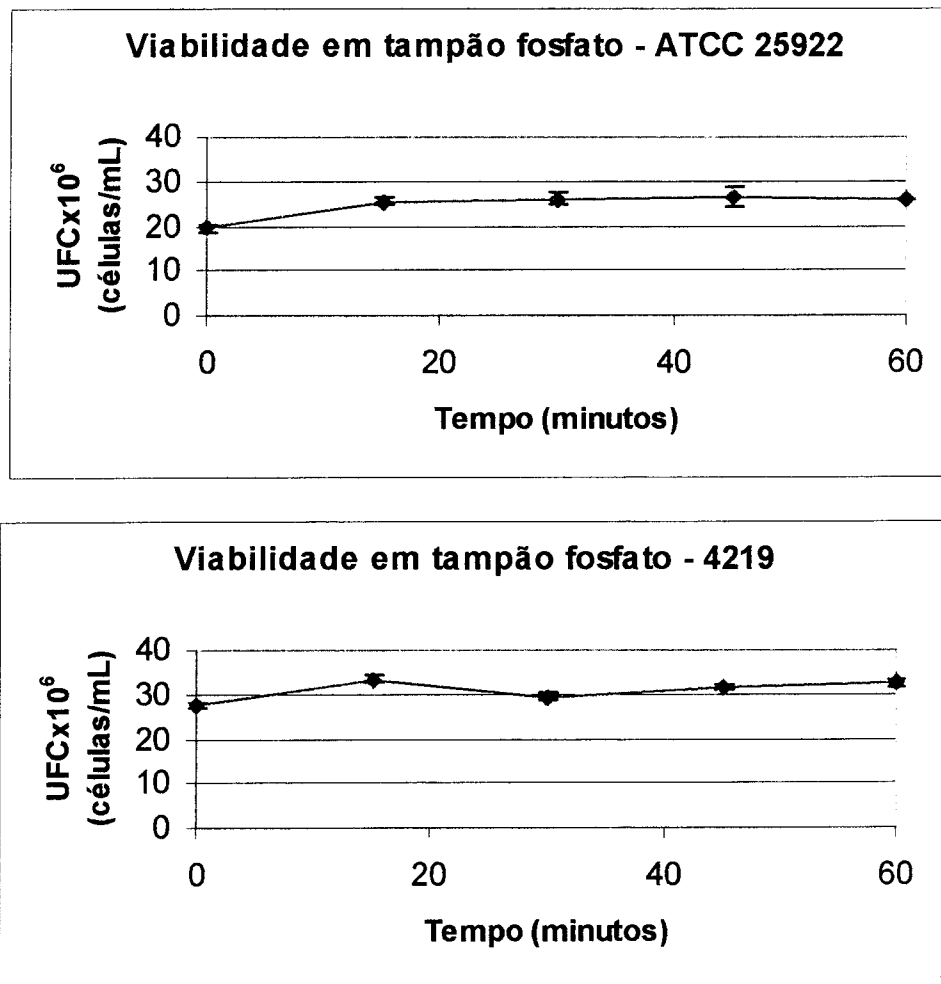


Figura 5: Curva de sobrevivência das linhagens ATCC 25922 e 4219 em tampão fosfato.

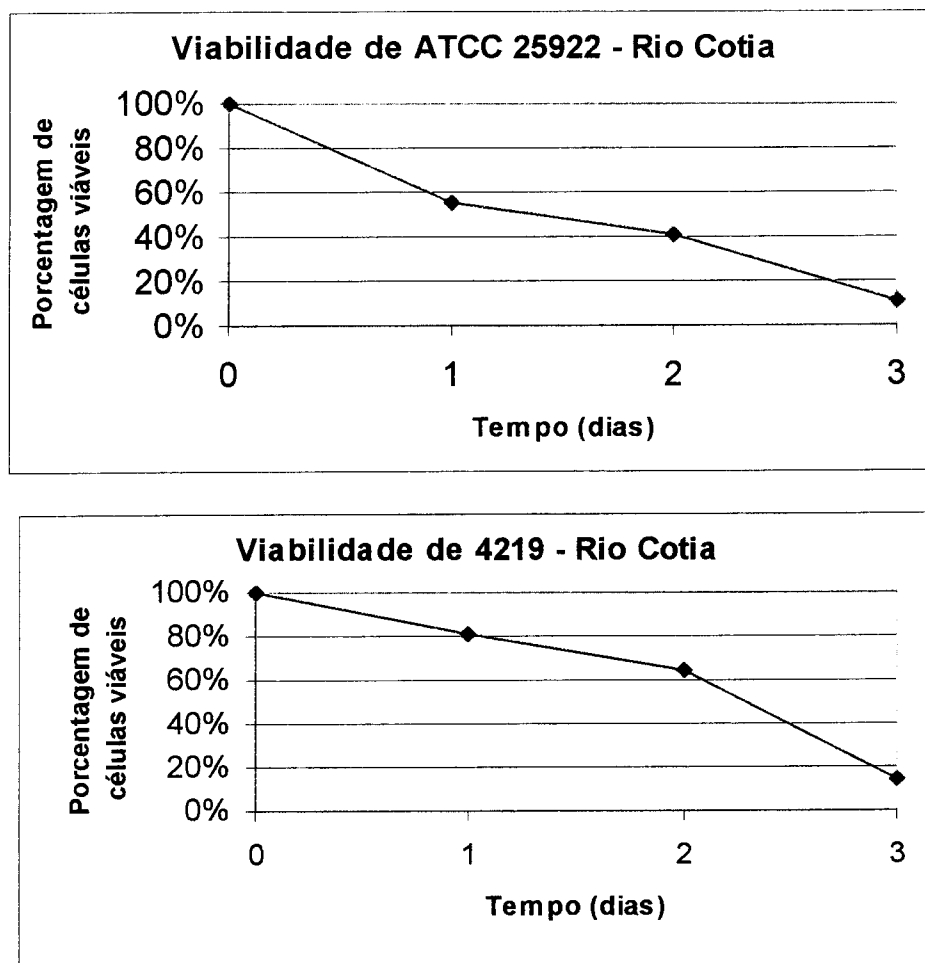


Figura 6: Curva de sobrevivência das linhagens ATCC 25922 e 4219 quando mantidas em água do rio Cotia.

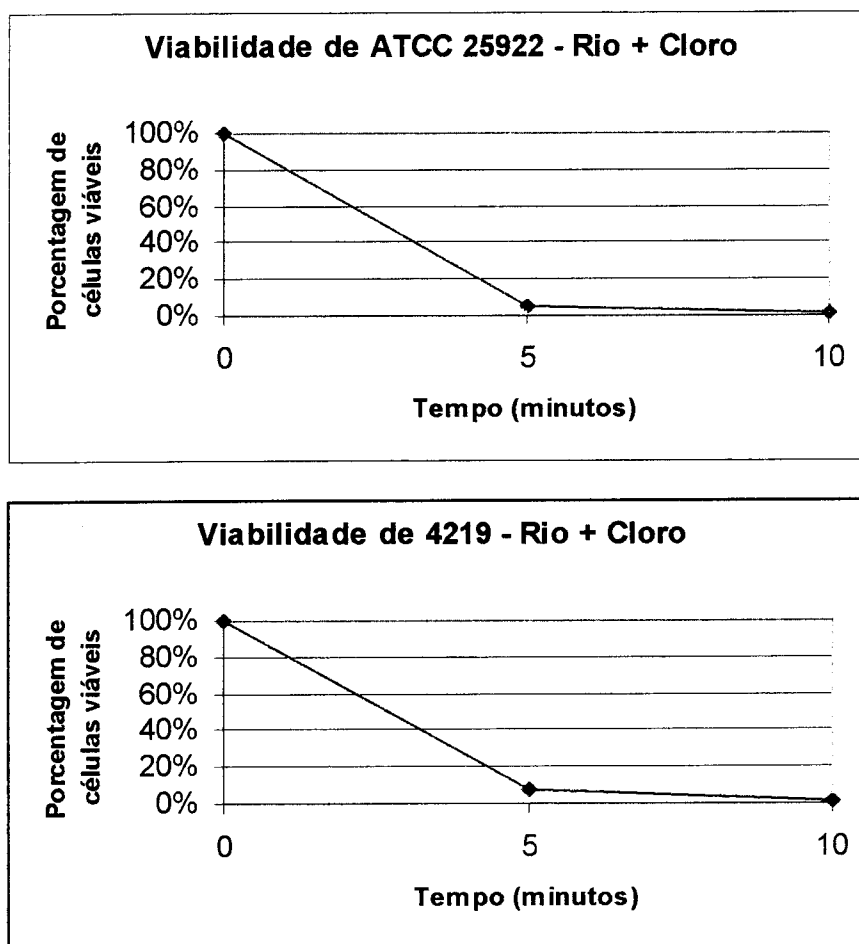


Figura 7: Curvas de sobrevivência das linhagens ATCC 25922 e 4219 após 12 horas de cultivo em água do rio Cotia e tratamento com 10 mg/L de cloro.

O tratamento das linhagens com cloro logo após manutenção em meio LB mostrou que a linhagem 4219 resiste ao estresse por mais tempo que a ATCC 25922. Do mesmo modo, após as primeiras horas de manutenção em água do rio Cotia, a população de 4219 sofre menor redução que a de ATCC 25922. Porém, após 2 tratamentos estressantes, o perfil de sobrevivência das duas linhagens é semelhante, indicando que a permanência em água provoca aumento da sensibilidade de 4219 ao cloro.

Matin & Harakeh (1990) observaram que as proteínas sintetizadas em resposta a limitação de nutrientes provoca aumento da resistência de *E. coli* a variação de temperatura e a presença de agentes oxidantes. A limitação de nutrientes é uma condição normalmente encontrada no ambiente aquático (Hobbie, 1966; Gray, 1976; Morita, 1982) e poderia contribuir para o aumento da resistência de microrganismos ao processo de desinfecção (Laplace *et al.*, 1997). Em experimentos com *Enterococcus faecalis* foi observado que na fase estacionária (estado mais comum dos microrganismos em água) ocorre aumento da resistência ao tratamento com hipoclorito de sódio, em relação às células que estão na fase exponencial (Laplace *et al.*, 1997). Hartke *et al.* (1998) observaram o aumento da resistência de *E. faecalis* a temperatura, variações de pH e hipoclorito de sódio após a permanência em água.

Nos experimentos realizados, observou-se que amostras cultivadas em água antes do tratamento com cloro sofriam redução mais acentuada no número de UFC que amostras cultivadas em LB. Estes resultados podem ter sido influenciados pela alta concentração de poluentes domésticos e industriais encontrados no rio Cotia. A figura 8 mostra o local de captação de água da Estação de Tratamento de Água do Baixo Cotia, na época de realização dos experimentos (novembro/2000). A análise da qualidade da água indicou que durante o ano de 2000 ocorreu aumento na quantidade de poluentes e foram encontrados níveis elevados de contaminação por *Giardia* sp, coliformes fecais e estreptococos fecais. Nos meses de março e novembro verificou-se a presença de atividade mutagênica, avaliada pelo teste de Ames e na região da captação, verificou-se que o potencial de formação de trihalometanos era elevado (CETESB, 2001). É bem provável que além do estresse por limitação de nutrientes, as amostras incubadas nesta água tiveram que se ajustar a presença de fenóis, metais pesados entre outros compostos ali encontrados.

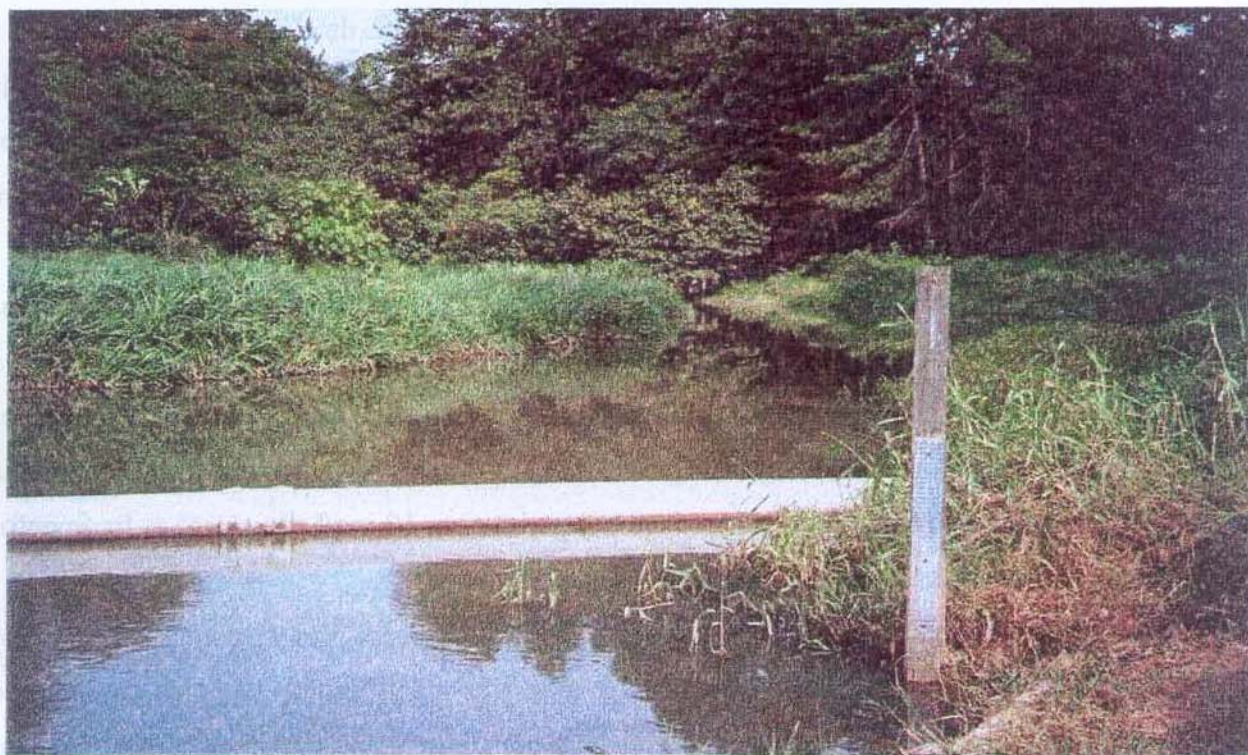


Figura 8: Local de captação de água da Estação de Tratamento de Água do Baixo Cotia. É possível observar o baixo nível de água na época da realização das curvas de sobrevivência e extração de RNA.

## 2. Isolamento de fragmentos expressos diferencialmente

A partir da análise das curvas de sobrevivência foram determinadas as condições para extração de RNA. Os controles foram constituídos por amostras mantidas em meio LB, a 37°C e 250 rpm por 4 horas. Para detectar genes induzidos ou reprimidos em resposta ao cloro, as amostras foram tratadas com 10 mg/L do desinfetante por 2,5 minutos. Para detectar diferenças na resposta ao cloro quando as amostras eram mantidas previamente em água, as linhagens foram incubadas por 12 horas em água do rio Cotia e tratadas com 10 mg/L de cloro por 2,5 minutos.

As células obtidas nas condições descritas acima foram utilizadas para a extração de RNA. A partir deste material, foram sintetizados os cDNAs correspondentes, utilizando-se os *primers* arbitrários J04, J12, J14 e J15 (OPERON *Technologies*). Estes cDNAs foram amplificados e separados por eletroforese em gel desnaturante.

Um grande número de fragmentos foi isolado dos géis de RAP-PCR (tabelas 1 e 2, figuras 9A a 24A). Foram consideradas diferenciais:

- 1) fragmentos que apresentaram intensidade variável quando comparados os controles (amostras mantidas a 37°C, 250 rpm, meio LB por 4 horas) com as amostras em estresse (amostras crescidas nas condições acima e tratadas com 10 mg/L de cloro) e, fragmentos presentes em uma destas condições, mas ausentes na outra;
- 2) fragmentos que apresentaram intensidade variável ou estavam presentes em uma condição e ausentes na outra, quando comparadas as amostras mantidas por 12 horas em água do rio Cotia e amostras que receberam tratamento com cloro após a manutenção em água do rio.

Um total de 351 fragmentos foram isolados dos géis de RAP-PCR, sendo 177 da linhagem ATCC 25922 e 174 da linhagem 4219. Para a linhagem ATCC 25922, o maior número de fragmentos diferenciais foi isolado de amostras cultivadas em rio (55 fragmentos) e em LB (52 fragmentos), já em amostras tratadas com cloro após cultivo em LB foram isolados 39 fragmentos diferenciais e de amostras tratadas com cloro após cultivo em água foram isolados 31 fragmentos. Para a linhagem 4219, o maior número de fragmentos diferenciais foi isolado de amostras cultivadas em LB (53 fragmentos) e de amostras tratadas com cloro após cultivo em água (52 fragmentos), o tratamento com cloro após cultivo em LB permitiu o isolamento de 35 fragmentos e de amostras cultivadas em água foram isolados 34 fragmentos.

Tabela 1: Número de fragmentos diferenciais isolados dos géis de RAP-PCR, por *primer* e por tratamento, para a linhagem ATCC 25922.

<i>Primer</i>	Tratamentos				Total
	LB	LB + Cl	Rio	Rio + Cl	
J4	1	6	5	7	19
J12	20	10	10	8	48
J14	10	18	23	3	54
J15	21	5	17	13	56
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>39</b>	<b>55</b>	<b>31</b>	<b>177</b>

Tabela 2: Número de fragmentos diferenciais isolados dos géis de RAP-PCR, por *primer* e por tratamento, para a linhagem 4219.

<i>Primer</i>	Tratamentos				Total
	LB	LB + Cl	Rio	Rio + Cl	
J4	1	4	5	31	41
J12	27	2	7	3	39
J14	17	14	17	8	56
J15	8	15	5	10	38
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>35</b>	<b>34</b>	<b>52</b>	<b>174</b>

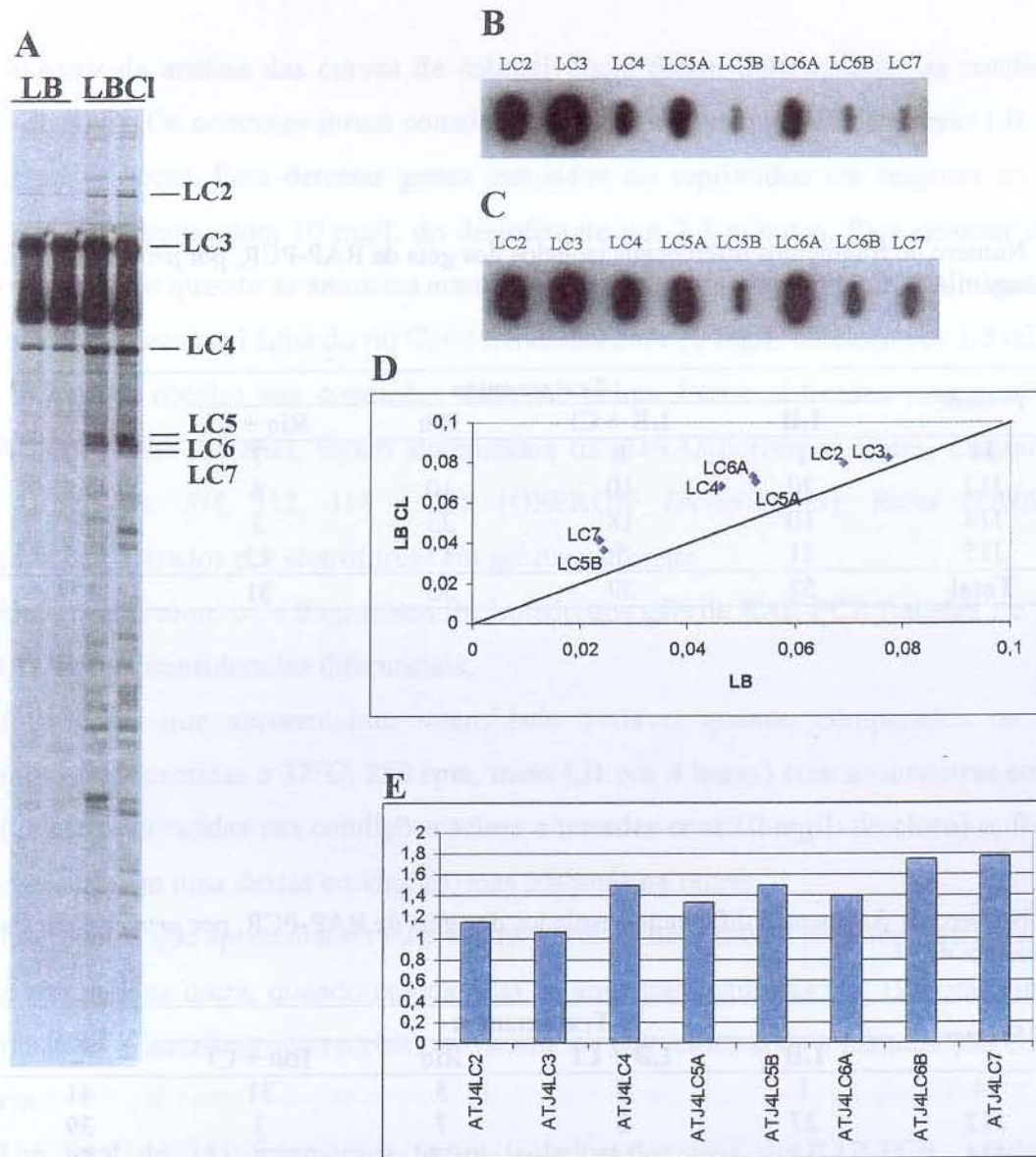


Figura 9: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J4. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento.

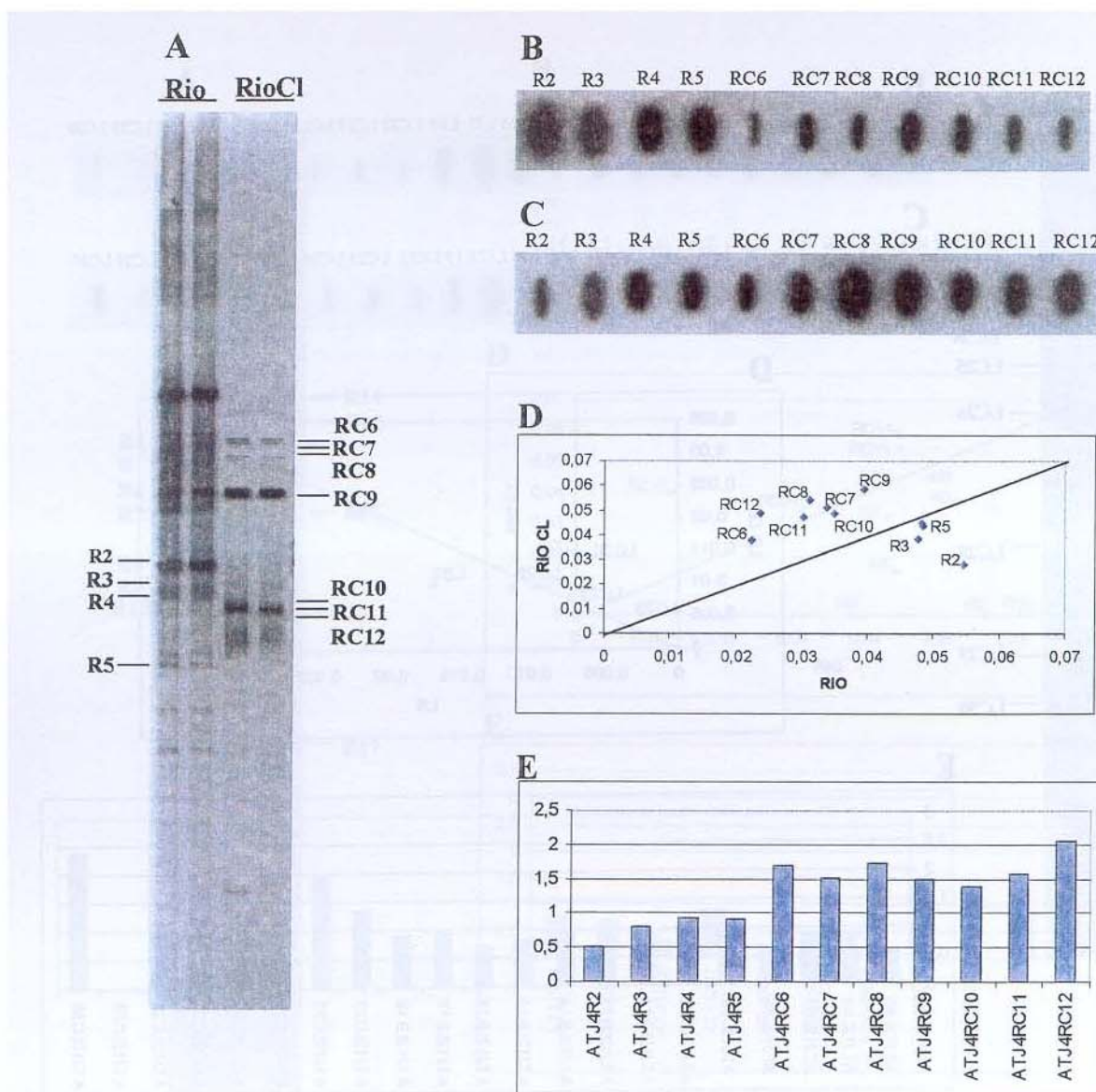


Figura 10: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J4. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante.

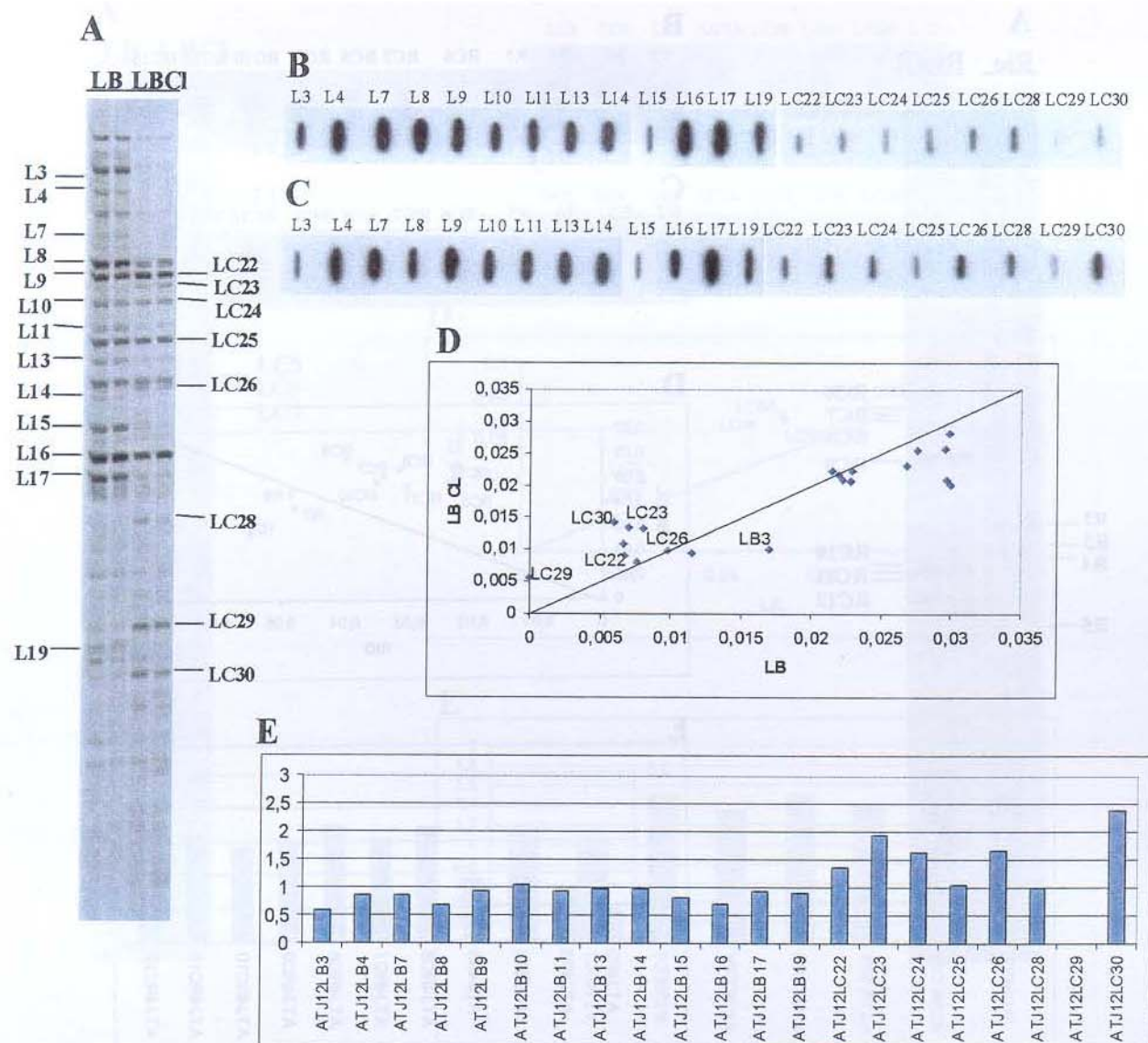


Figura 11: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J12. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizadas com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento. O coeficiente de expressão de ATJ12LC29 não foi calculado por se tratar de um fragmento detectado apenas em amostras tratadas com cloro.

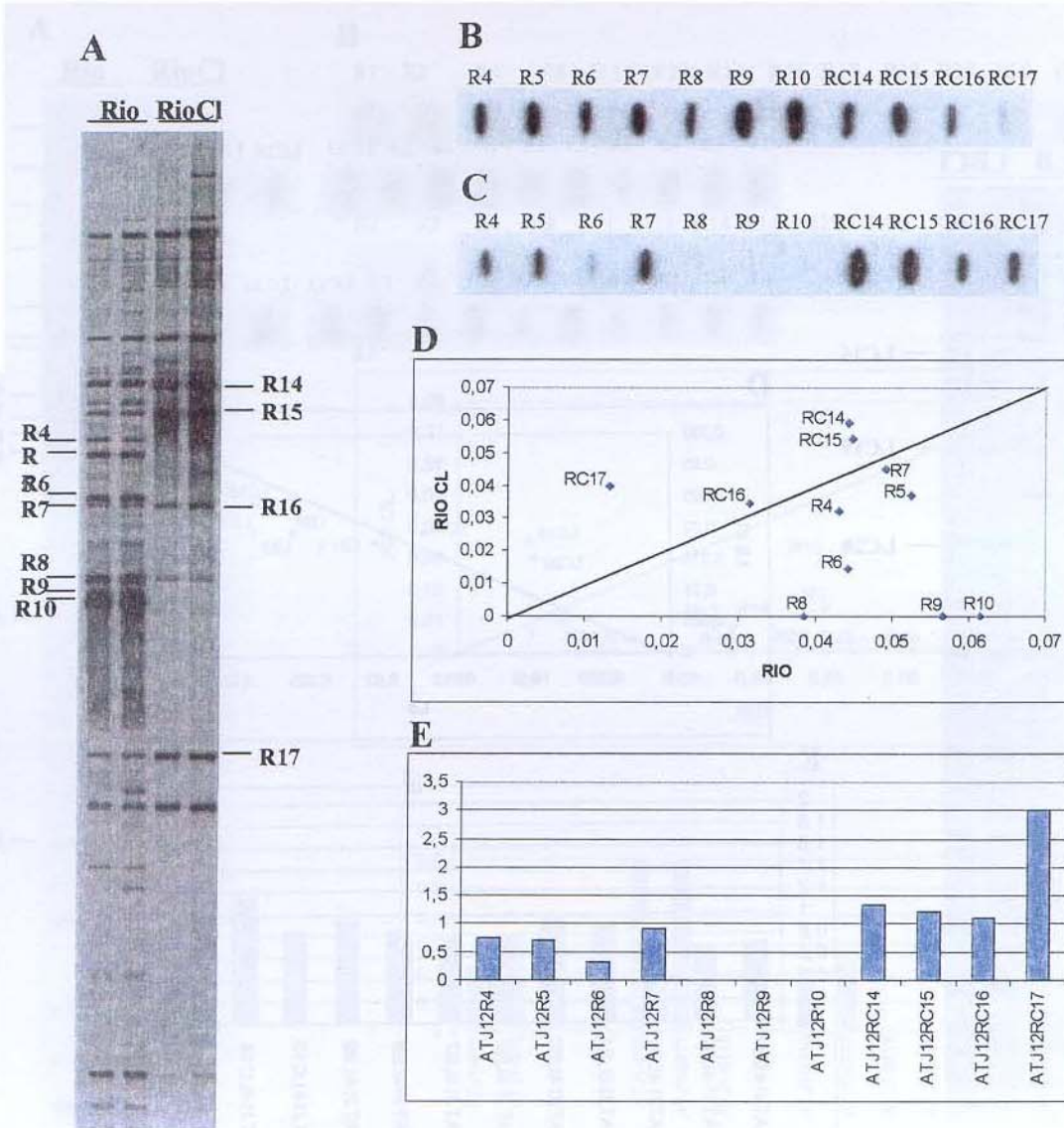


Figura 12: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J12. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante. Os coeficientes de expressão de ATJ12R8, ATJ12R9 e ATJ12R10 não foram calculados por serem fragmentos detectados apenas em amostras cultivadas em água.

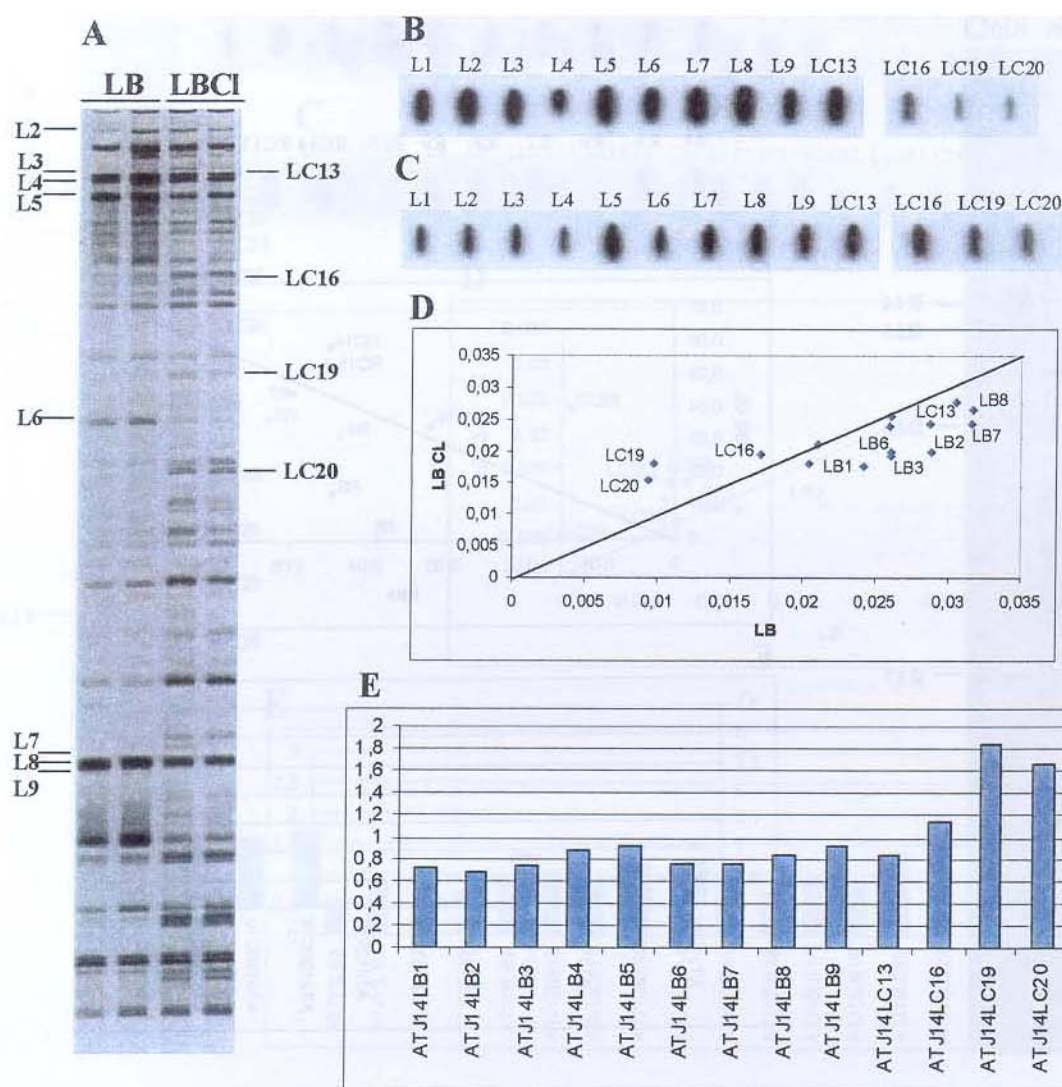


Figura 13: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J14. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento.

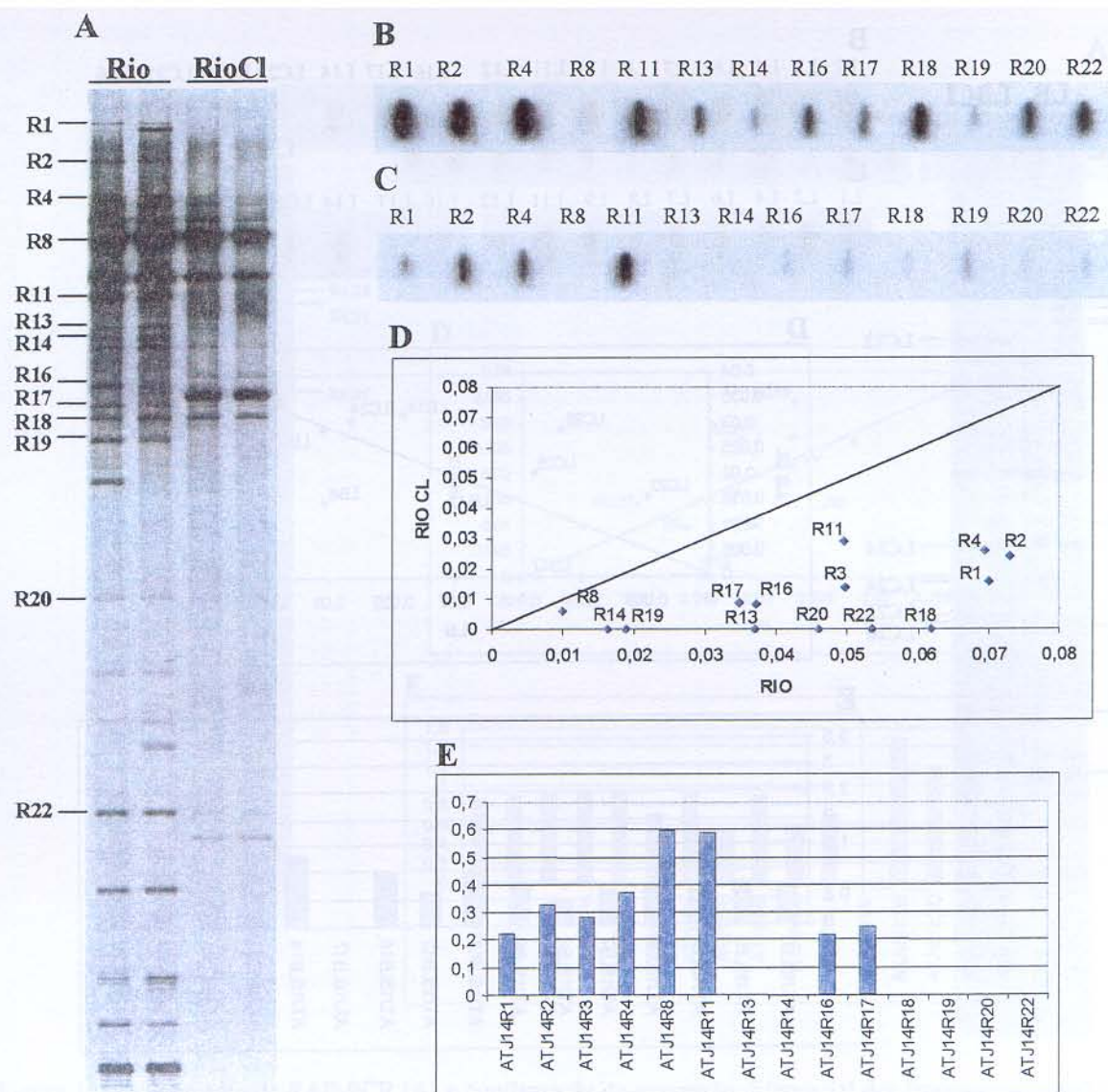


Figura 14: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J14. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante. Os coeficientes de expressão de ATJ14R13, ATJ14R14, ATJ14R18, ATJ14R19, ATJ14R20 e ATJ14R22 não foram calculados por serem fragmentos detectados apenas em amostras tratadas com cloro.

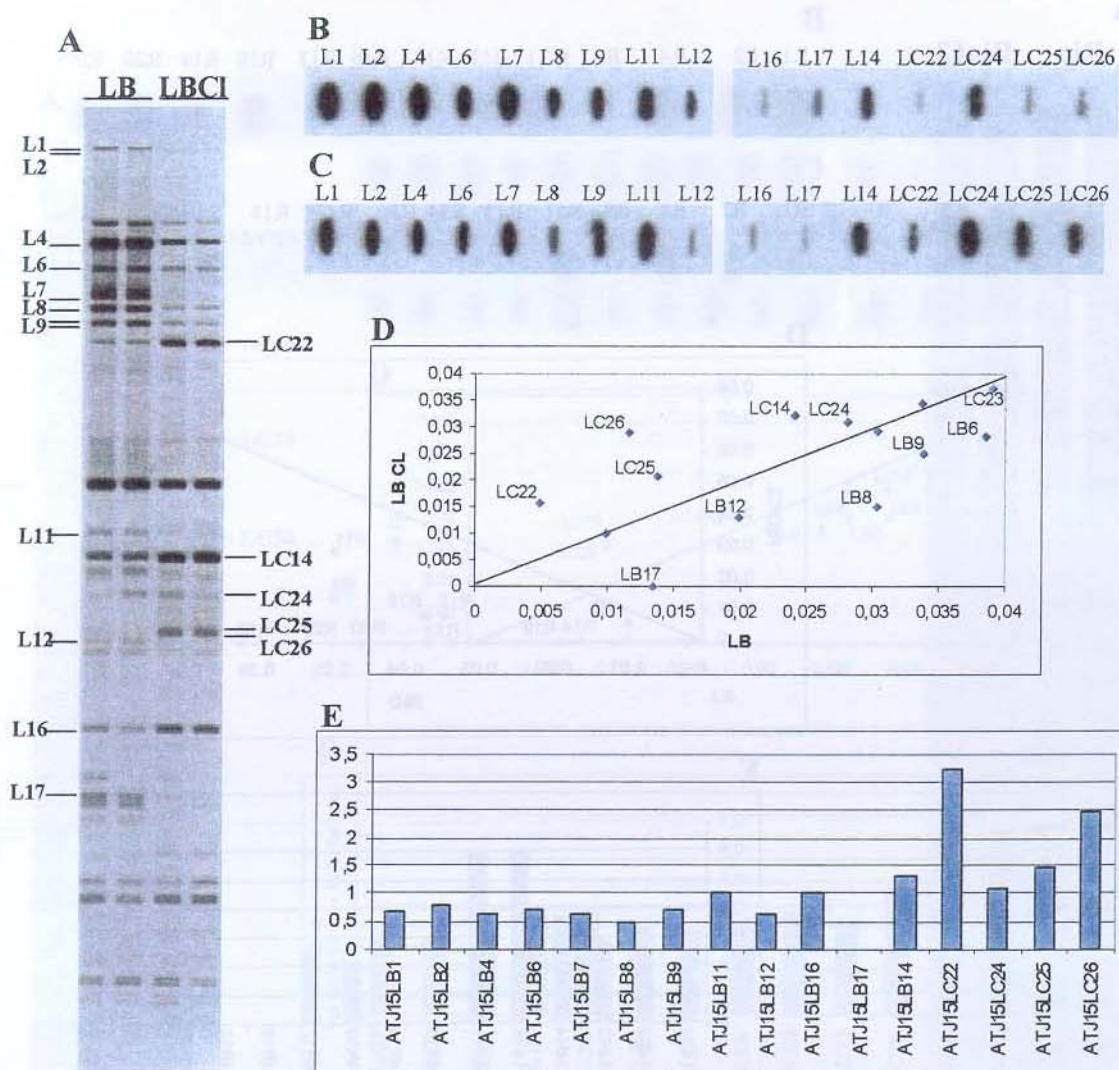


Figura 15: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J15. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento. O coeficiente de expressão de ATJ15LB17 não foi calculado por se tratar de fragmento detectado apenas em amostras tratadas com cloro.

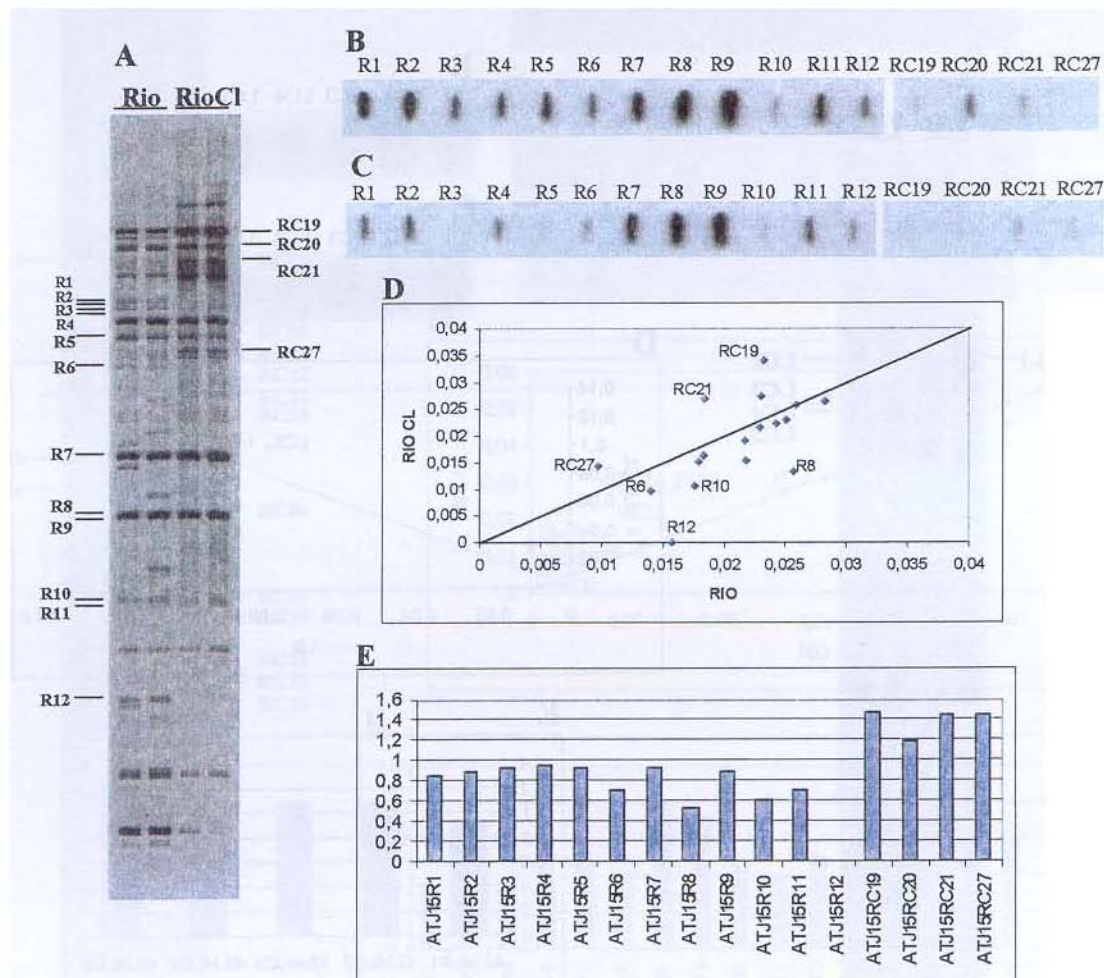


Figura 16: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J15. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante. O coeficiente de expressão de ATJ15R12 não foi calculado por se tratar de fragmento detectado apenas em amostras cultivadas em água.

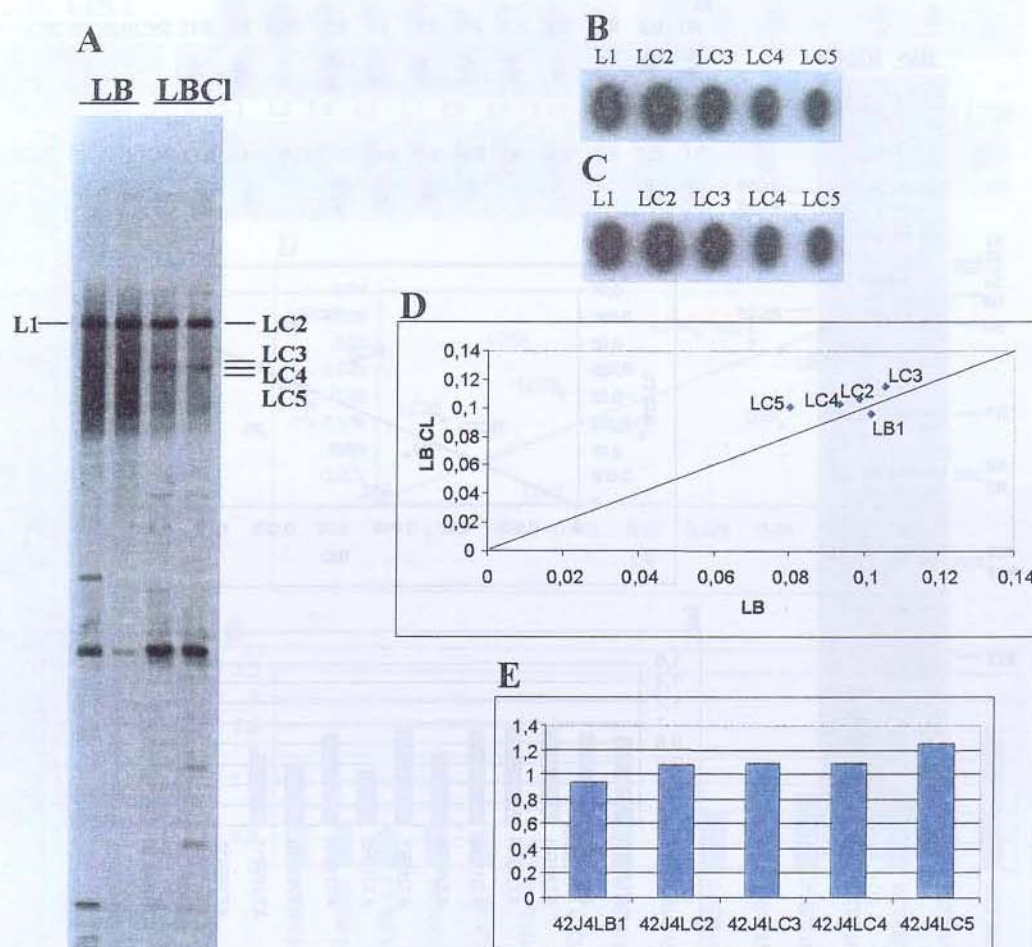


Figura 17: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J4. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento.

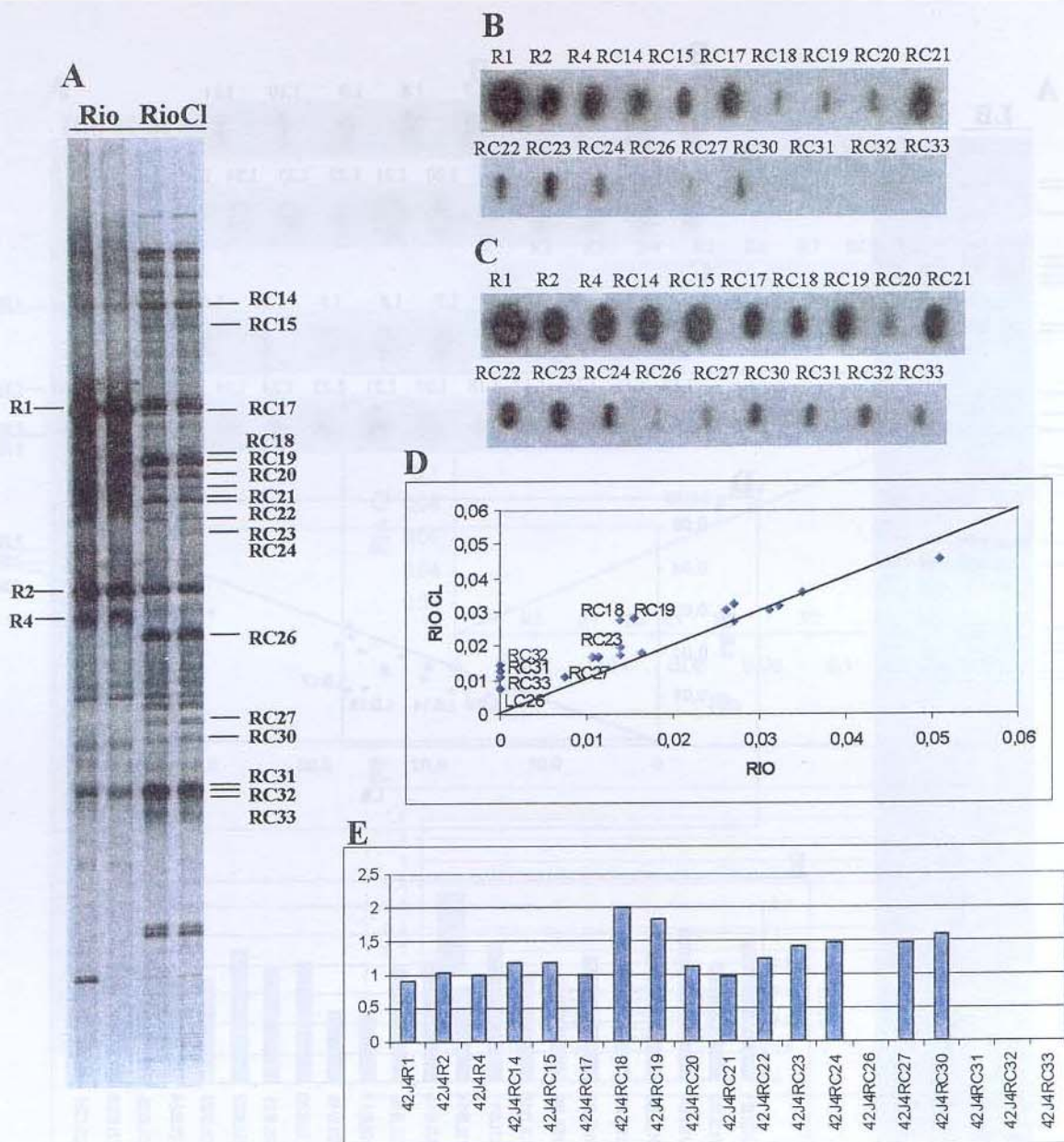


Figura 18: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J4. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante. Os coeficientes de expressão de 42J4RC26, 42J4RC31, 42J4RC32 e 42J4RC33 não foram calculados por se tratar de fragmentos detectados apenas em amostras tratadas com cloro.

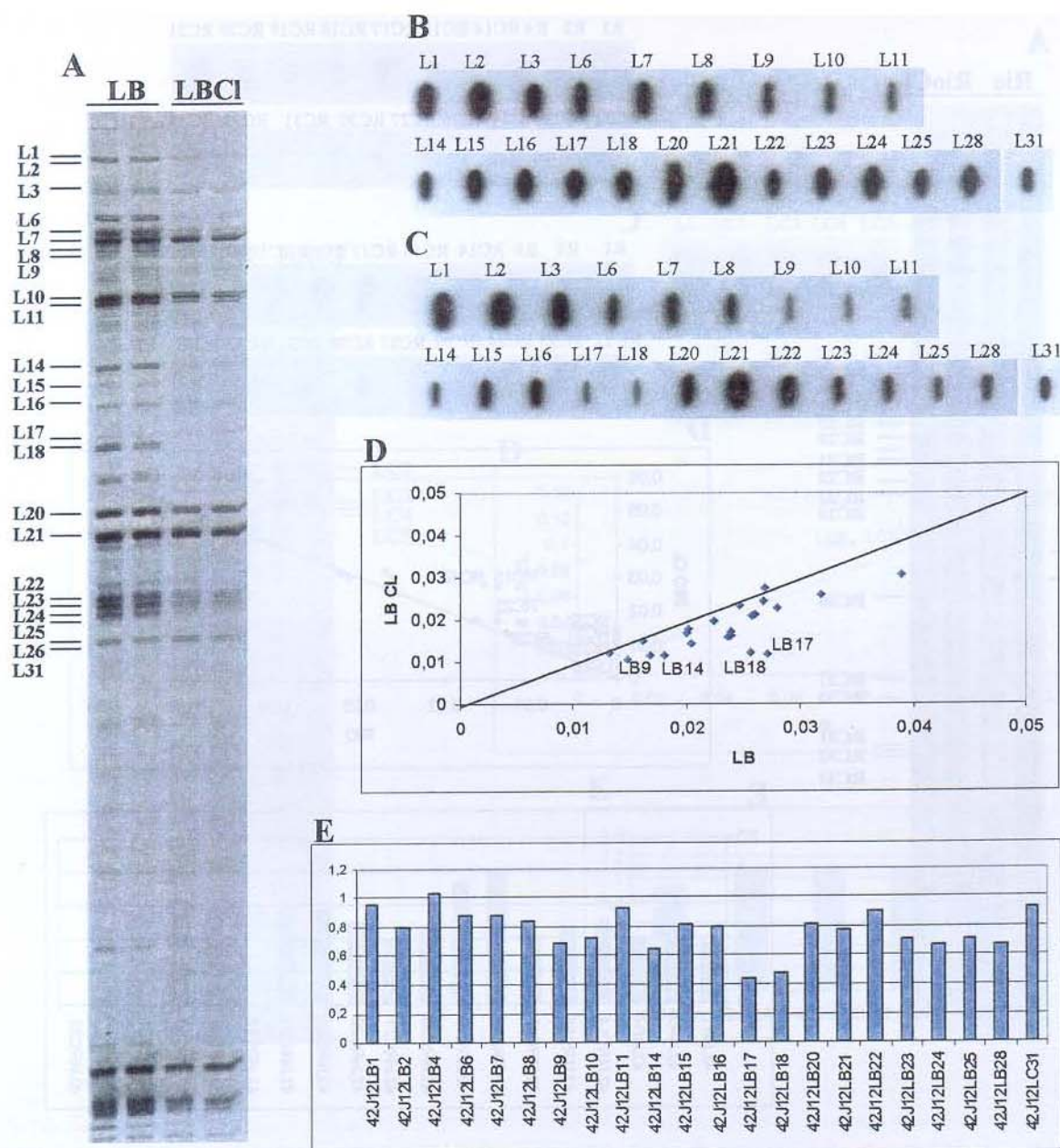


Figura 19: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J12. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento.

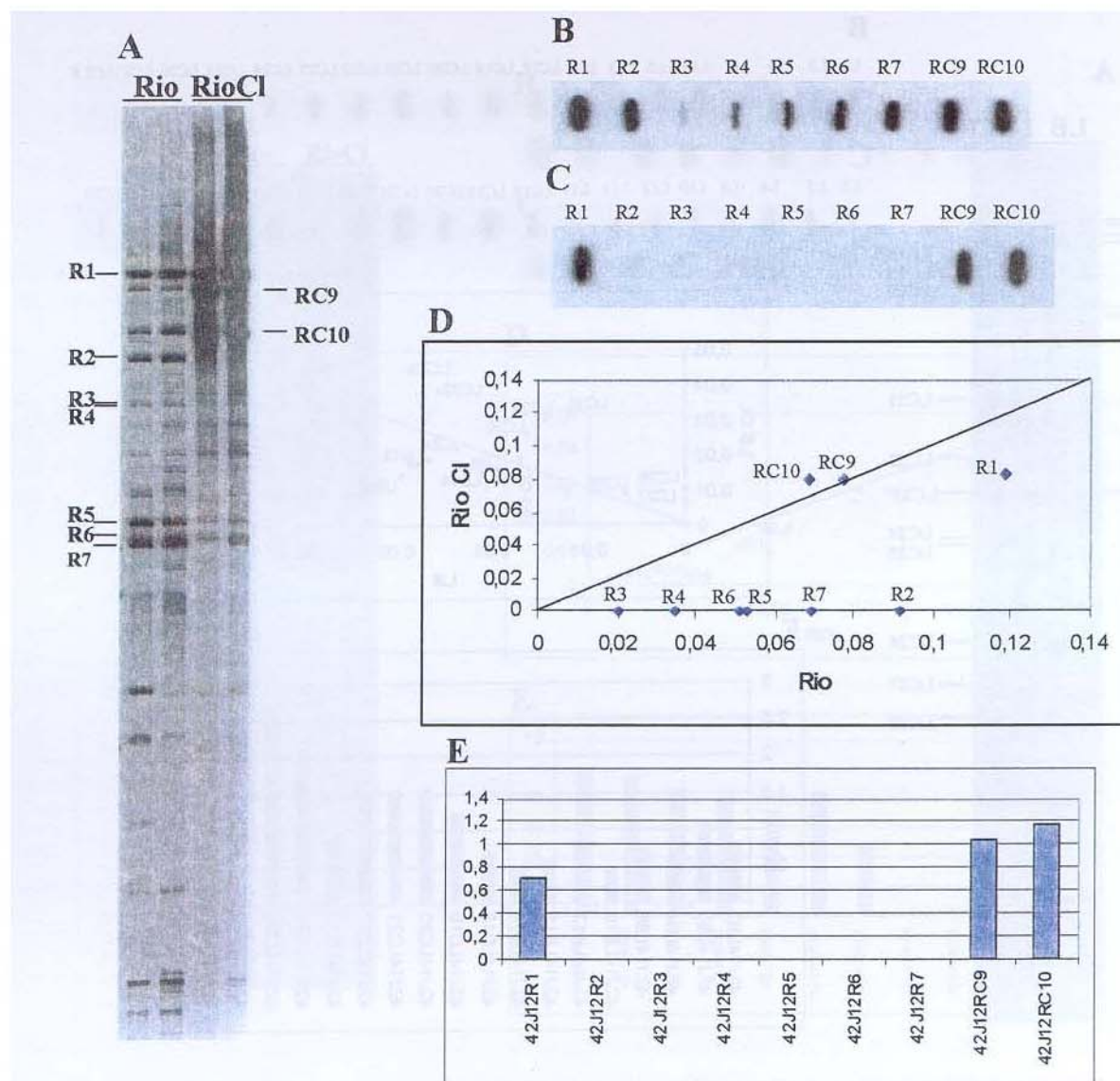


Figura 20: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J12. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante. Os coeficientes de expressão de 42J12R2, 42J12R3, 42J12R4, 42J12R5, 42J12R6 e 42J12R7 não foram calculados por se tratar de fragmentos detectados apenas em amostras cultivadas em água.

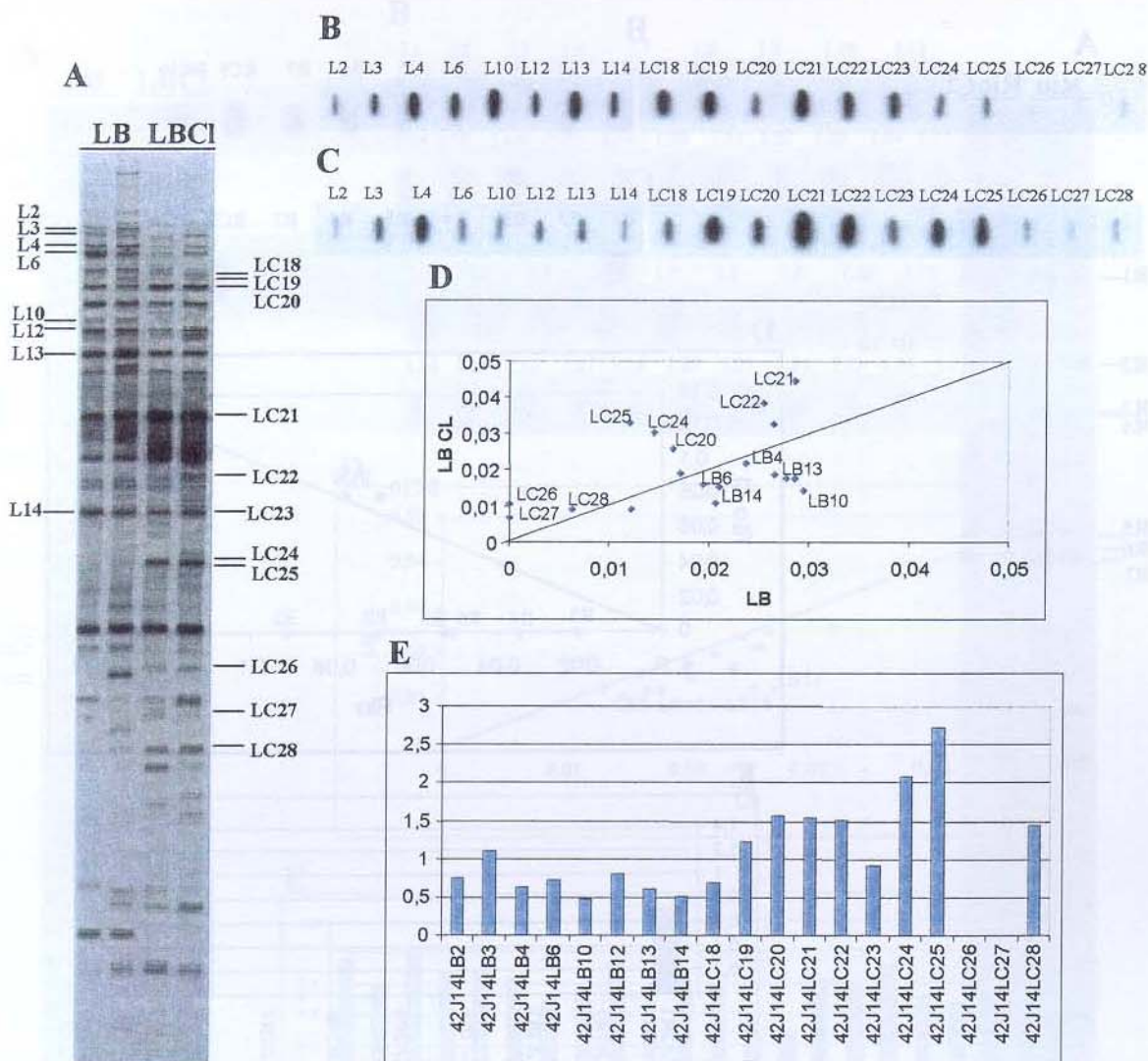


Figura 21: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J14. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento. Os coeficientes de expressão de 42J14LC26 e 42J14LC27 não foram calculados por se tratar de fragmentos detectados apenas em amostras tratadas com cloro.

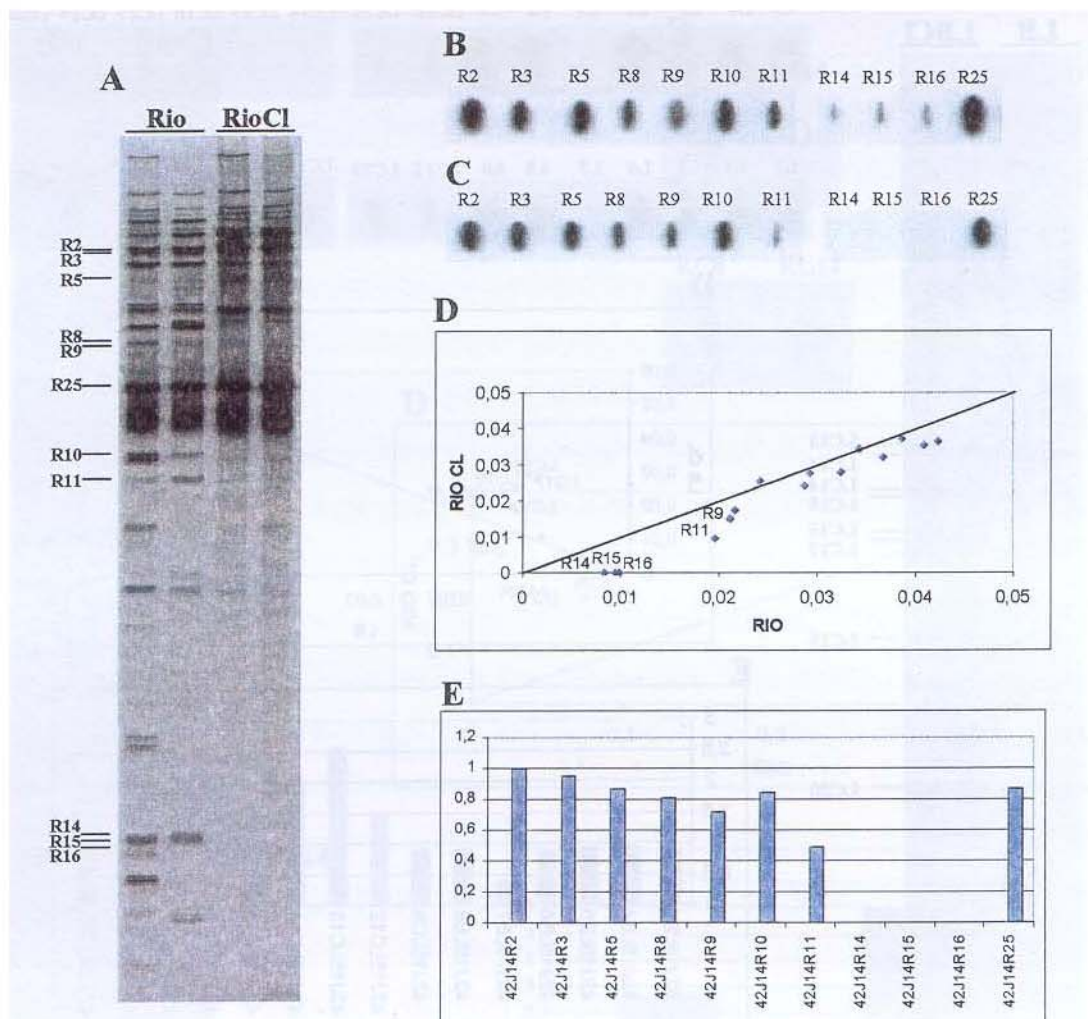


Figura 22: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J14. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante. Os coeficientes de expressão de 42J14R14, 42J14R15 e 42J14R16 não foram calculados por se tratar de fragmentos detectados apenas em amostras cultivadas em água.

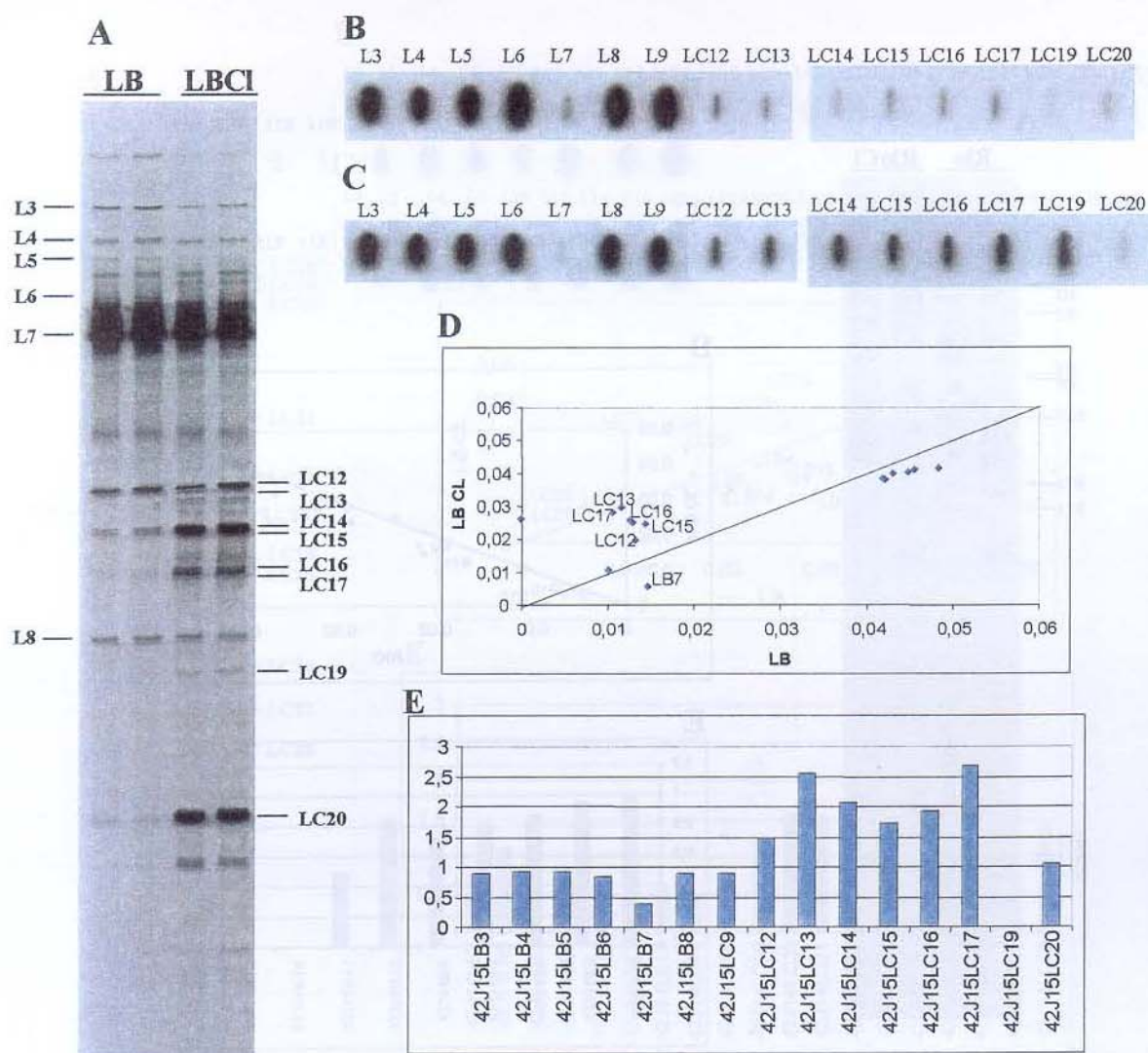


Figura 23: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, utilizando-se o *primer* J15. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em LB. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sonda obtida de amostra tratada com cloro após cultivo em LB. Em D, gráfico de dispersão indicando em qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em LB. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida por este tratamento. O coeficiente de expressão de 42J15LC19 foi calculado por se tratar de fragmento detectado apenas em amostras tratadas com cloro.

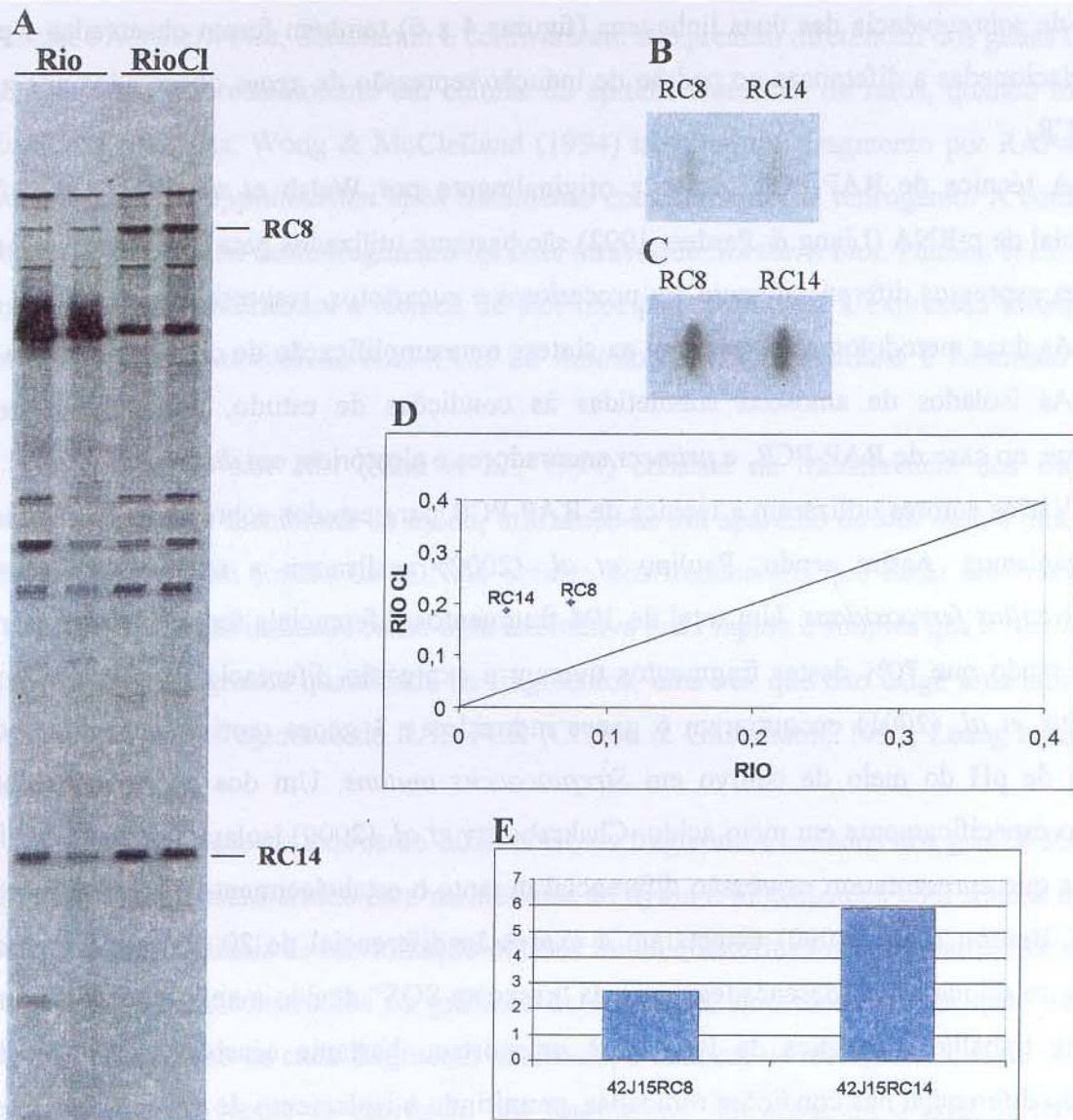


Figura 24: Experimento de RAP-PCR (A) e confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados do gel de RAP-PCR (B a E). Em A, gel de RAP-PCR da linhagem 4219 comparando amostras cultivadas em água e tratadas com cloro após cultivo em água, utilizando-se o *primer* J15. Os fragmentos considerados diferenciais estão indicados na figura. Em B e C, experimentos de *slot blot*. Em B, membrana hibridizada com sonda obtida de amostra cultivada em água. Em C, os mesmos fragmentos hibridizados com sondas obtidas de amostras tratadas com cloro após cultivo em água. Em D, gráfico de dispersão indicando qual condição ocorre maior expressão dos fragmentos analisados por *slot blot*. Fragmentos representados acima da reta  $x=y$  são mais expressos em amostras tratadas com cloro e fragmentos representados abaixo da reta são mais expressos em amostras cultivadas em água. Em E, histograma representado o coeficiente de expressão de cada fragmento. Valores acima de 1 indicam fragmentos com expressão induzida pelo tratamento com cloro e valores abaixo de 1 indicam fragmentos que tiveram expressão reprimida pelo desinfetante.

Os perfis de bandas obtidos para as duas linhagens foram distintos entre si. Diferenças no padrão de sobrevivência das duas linhagens (figuras 4 a 6) também foram observadas e podem estar relacionadas a diferenças no padrão de indução/repressão de genes observados nos géis de RAP-PCR.

A técnica de RAP-PCR, descrita originalmente por Welsh *et al.* (1992) e o *display* diferencial de mRNA (Liang & Pardee, 1992) são bastante utilizados para detecção e isolamento de genes expressos diferencialmente em procariotos e eucariotos, respectivamente (Nagel *et al.*, 2001). As duas metodologias se baseiam na síntese e na amplificação de cDNAs obtidos a partir de RNAs isolados de amostras submetidas às condições de estudo, utilizando-se *primers* aleatórios, no caso do RAP-PCR, e *primers* ancoradores e aleatórios, em *display* diferencial.

Vários autores utilizaram a técnica de RAP-PCR para estudos sobre expressão gênica em microrganismos. Assim sendo, Paulino *et al.* (2002) analisaram a resposta ao cobre em *Acithiobacillus ferrooxidans*. Um total de 104 fragmentos diferenciais foram isolados por estes autores sendo que 70% destes fragmentos tiveram a expressão diferencial confirmada por *slot blot*. Chia *et al.* (2001) encontraram 6 genes induzidos e 3 genes reprimidos, em resposta a redução de pH do meio de cultivo em *Streptococcus mutans*. Um dos genes induzidos, era expresso especificamente em meio ácido. Chakraborty *et al.* (2000) isolaram 5 genes em *Vibrio cholerae* que apresentaram expressão diferencial durante o estabelecimento de uma infecção em coelhos. Benson *et al.* (2000) detectaram a expressão diferencial de 20 genes em *Salmonella enterica*, relacionados ao desencadeamento da “resposta SOS” devido a aplicação de mitomicina C. Neste trabalho, a técnica de RAP-PCR se mostrou bastante sensível para detecção da expressão diferencial nas condições estudadas, permitindo o isolamento de um grande número de fragmentos, com uma baixa proporção de falso-positivos.

### **3. Confirmação e análise da expressão diferencial dos fragmentos isolados através de RAP-PCR**

A utilização da técnica de RAP-PCR para detecção e isolamento de fragmentos expressos diferencialmente normalmente resulta na ocorrência de um grande número de falsos-positivos (Nagel *et al.*, 2001), o que torna necessária a confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados. Entre os métodos mais utilizados para confirmação da expressão diferencial

estão o *Northern blot* e o *slot blot*. Ogawa *et al.* (2000), utilizando as técnicas de *display* diferencial e *Northern blot*, detectaram e confirmaram a expressão diferencial dos genes *CRS4C* e *SAAL*, expressos diferencialmente em células do epitélio intestinal de ratos, quando infectadas por bactérias entéricas. Wong & McClelland (1994) isolaram um fragmento por RAP-PCR em *Salmonella enterica Typhimurium* após tratamento com peróxido de hidrogênio. A confirmação da expressão diferencial deste fragmento foi feita através de *Northern blot*. Paulino *et al.* (2002) e Leung *et al.* (2000) utilizaram a técnica de slot blot para confirmar a expressão diferencial de fragmentos isolados através de RAP-PCR de *Acithiobacillus ferrooxidans* e *Lentinula edodes*, respectivamente.

O método de *slot blot* (Mou *et al.*, 1994) consiste na transferência dos fragmentos diferenciais para uma membrana de nylon, utilizando-se um aparelho de *slot blot*, e hibridização destes fragmentos com sondas de cDNAs obtidos dos tratamentos que estão sendo estudados. Esta técnica vem sendo utilizada como uma alternativa mais rápida e simples que o *Northern blot* para análise de uma grande quantidade de fragmentos, uma vez que não exige uma hibridização para análise de cada fragmento de RAP-PCR (Corton & Gustafsson, 1997; Leung *et al.*, 2000; Paulino *et al.*, 2002).

Para confirmação da expressão diferencial, os fragmentos isolados dos géis de RAP-PCR foram amplificados, transferidos para membranas de nylon e hibridizados com sondas marcadas radioativamente. Os sinais de hibridização obtidos foram quantificados e normalizados, e a partir destes valores foram construídos os gráficos de dispersão, que mostram em qual tratamento houve maior expressão de cada fragmento analisado, e também os histogramas, onde observa-se os valores dos coeficientes de expressão dos fragmentos, que mostram o grau de indução ou repressão pela aplicação de cloro (figuras 9 a 24).

Dos 177 fragmentos diferenciais isolados dos géis de RAP-PCR para a linhagem ATCC 25922, 154 foram analisados por *slot blot*. Destes, 116 (aproximadamente 75%) tiveram expressão diferencial confirmada. Para a linhagem 4219, foram isolados 174 fragmentos diferenciais dos géis de RAP-PCR. Foram analisados por *slot blot* 132 fragmentos, dos quais 108 (81%) tiveram expressão diferencial confirmada (tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados através de RAP-PCR, para a linhagem ATCC 25922.

<i>Primer</i>	Número de fragmentos analisados	Número de fragmentos confirmados e respectivos tratamentos				Total de fragmentos confirmados
		LB	LB+Cl	Rio	Rio+Cl	
J4	21	0	8	4	7	19
J12	42	13	9	7	4	33
J14	48	9	6	14	0	29
J15	43	12	6	12	5	35
<b>Total</b>	<b>154</b>	<b>34</b>	<b>29</b>	<b>37</b>	<b>16</b>	<b>116</b>

Tabela 4: Confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados através de RAP-PCR, para a linhagem 4219.

<i>Primer</i>	Número de fragmentos analisados	Número de fragmentos confirmados e respectivos tratamentos				Total de fragmentos confirmados
		LB	LB+Cl	Rio	Rio+Cl	
J4	30	1	4	3	17	25
J12	35	21	1	7	3	32
J14	45	8	11	12	3	34
J15	22	6	9	0	2	17
<b>Total</b>	<b>132</b>	<b>36</b>	<b>25</b>	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>108</b>

Os fragmentos que tiveram expressão diferencial confirmada foram hibridizados com sondas obtidas em cada um dos quatro tratamentos experimentais. Este procedimento permitiu que se verificasse o grau de expressão de cada um destes fragmentos em tratamentos diferentes dos quais haviam sido previamente isolados. Os sinais de hibridização dos fragmentos foram normalizados e os valores obtidos foram analisados com o auxílio dos programas *Cluster* e *TreeView* v. 1,45 (<http://rana.stanford.edu/software>) (figura 25). Nesta análise, as colunas indicam o padrão de expressão de cada fragmento em um determinado tratamento e as linhas indicam a variação da expressão de cada fragmento nos 4 tratamentos. A expressão mais acentuada em um determinado tratamento é representada em vermelho e a ausência de expressão é representada em amarelo. Valores intermediários de expressão são representados com combinações entre estas duas cores. Os padrões de expressão observados na figura 25, para as duas linhagens, indicaram diferenças entre as amostras tratadas com cloro e amostras tratadas com cloro após cultivo em água, mostrando a influência do estresse ambiental na resposta à aplicação do desinfetante. A análise das curvas de sobrevivência confirma esta observação, uma vez que a taxa de sobrevivência das amostras após cultivo em água e tratamento com cloro foi quase nula, enquanto nas amostras cultivadas em LB e tratadas com cloro, o efeito não foi tão drástico.

Os mesmos fragmentos diferenciais, das linhagens ATCC 25922 e 4219 foram analisados com o auxílio do programa *Gene Cluster* v.1,1 (<http://rana.stanford.edu/software>) (figuras 26 e 27). Com esta análise, os fragmentos diferenciais obtidos da linhagem ATCC 25922 foram separados em 30 grupos (identificados na figura 26 como c0 a c29) e os fragmentos da linhagem 4219 foram separados em 18 grupos (identificados na figura 27 como c0 a c17), de forma que em cada grupo fossem encontrados apenas fragmentos com mesmo padrão de expressão ao longo dos 4 tratamentos experimentais. Esta abordagem se mostra interessante, uma vez que genes pertencentes a um mesmo grupo, aparentemente, estão envolvidos com uma mesma função nos processos celulares, permitindo a inferência de funções para genes não caracterizados pertencentes a um mesmo grupo (Eisen *et al.*, 1998; Gash *et al.*, 2000).



Figura 25: Análise do padrão de expressão de todos os fragmentos que tiveram a expressão diferencial confirmada, nos 4 tratamentos estudados. Em A, padrão de expressão dos fragmentos isolados da linhagem ATCC 25922. Em B, padrão de expressão dos fragmentos isolados da linhagem 4219. Em vermelho, está indicada a expressão mais acentuada em um determinado tratamento. Em amarelo, a ausência de expressão. Valores intermediários de expressão estão indicados em tons intermediários entre amarelo e vermelho.

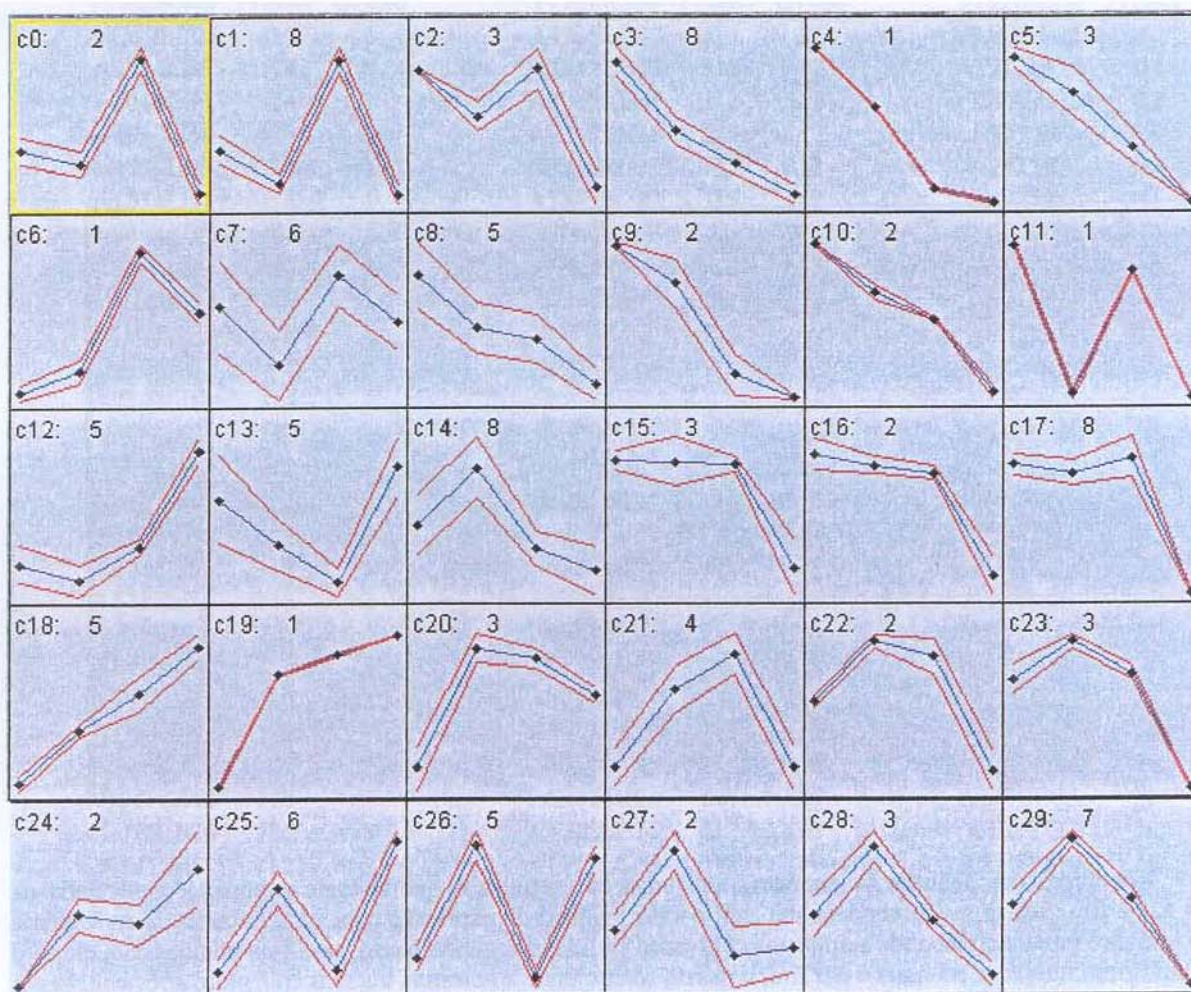


Figura 26: Resultados das análises da expressão de todos os fragmentos que tiveram expressão confirmada na linhagem ATCC 25922. Em cada grupo, observa-se em azul o valor relativo de expressão para cada tratamento, na seguinte ordem: o primeiro ponto corresponde a amostras cultivadas em LB, o segundo ponto, amostras tratadas com cloro, o terceiro, amostras cultivadas em água e por fim, o quarto corresponde a amostras tratadas com cloro após cultivo em água. As retas em vermelho indicam o desvio padrão desta análise.

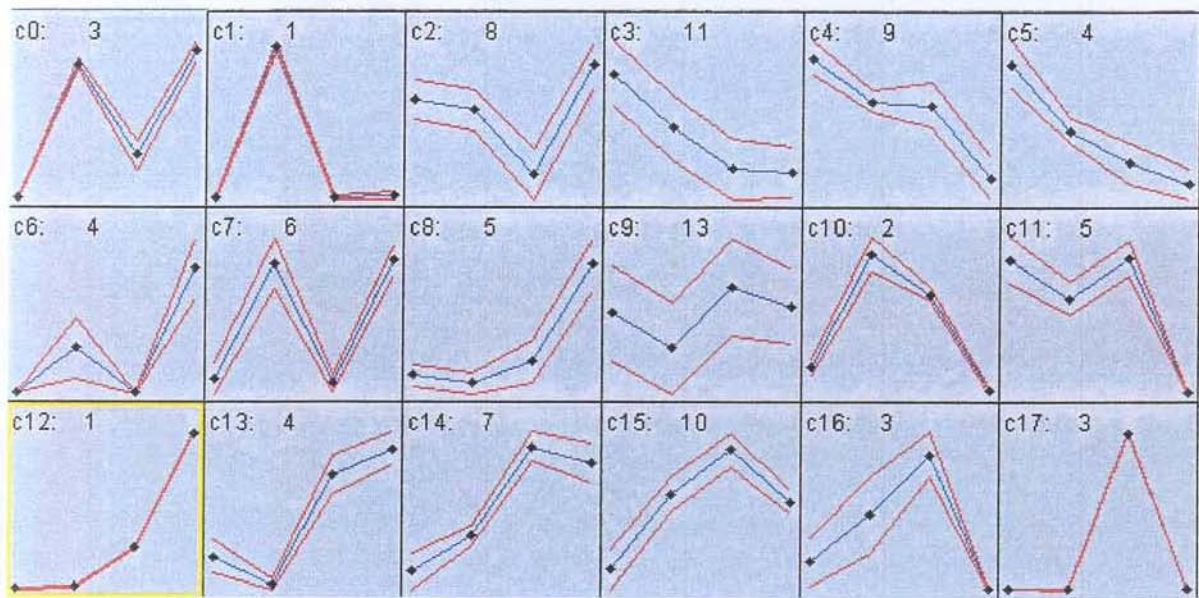


Figura 27: Resultados das análises da expressão de todos os fragmentos que tiveram expressão confirmada na linhagem 4219. Em cada grupo, observa-se em azul o valor relativo de expressão para cada tratamento, na seguinte ordem: o primeiro ponto corresponde a amostras cultivadas em LB, o segundo ponto, amostras tratadas com cloro, o terceiro, amostras cultivadas em água e por fim, o quarto corresponde a amostras tratadas com cloro após cultivo em água. As retas em vermelho indicam o desvio padrão desta análise.

Tabela 5: Descrição dos grupos a que cada fragmento diferencial da linhagem ATCC 25922 pertence, após análise realizada pelo programa *Gene Cluster*. Assinalados com asterisco, os fragmentos sequenciados.

Fragmento	Primer	Grupo	Fragmento	Primer	Grupo	Fragmento	Primer	Grupo
ATJ12LC25	J12	0	ATJ15LB17	J15	11	ATJ12LC23*	J12	19
ATJ14LB6	J14	0	ATJ12LB10	J12	12	ATJ12LC26	J12	20
ATJ14LB3	J14	1	ATJ12LB11	J12	12	ATJ12LC30*	J12	20
ATJ14LB4	J14	1	ATJ15RC19	J15	12	ATJ12R7	J12	20
ATJ14LB5	J14	1	ATJ15RC21	J15	12	ATJ12R5	J12	21
ATJ14LB7	J14	1	ATJ15RC27	J15	12	ATJ15R6	J15	21
ATJ14LB8	J14	1	ATJ4RC11	J4	13	ATJ15R10	J15	21
ATJ14LB9	J14	1	ATJ12LB9	J12	13	ATJ15R11	J15	21
ATJ14LC13	J14	1	ATJ12LB13	J12	13	ATJ12R6	J12	22
ATJ14LC14	J14	1	ATJ14LB2	J14	13	ATJ15R8	J15	22
ATJ4R2	J4	2	ATJ15RC20	J15	13	ATJ14R18	J14	23
ATJ14LB1	J14	2	ATJ4LC2	J4	14	ATJ14R20	J14	23
ATJ14R2	J14	2	ATJ4R4	J4	14	ATJ15LC24	J15	23
ATJ12LB3	J12	3	ATJ4R5	J4	14	ATJ12LC29	J12	24
ATJ12LB8	J12	3	ATJ14LC16	J14	14	ATJ12RC17*	J12	24
ATJ14R11	J14	3	ATJ15LB10	J15	14	ATJ4LC5B	J4	25
ATJ15LB1	J15	3	ATJ15LB11	J15	14	ATJ4LC6B	J4	25
ATJ15LB2	J15	3	ATJ15R7	J15	14	ATJ4RC6	J4	25
ATJ15LB6	J15	3	ATJ15R9	J15	14	ATJ4RC7	J4	25
ATJ15LB7	J15	3	ATJ4LC3	J4	15	ATJ4RC8*	J4	25
ATJ15LB8	J15	3	ATJ12LB14	J12	15	ATJ4RC12*	J4	25
ATJ14R8	J14	4	ATJ12LB17	J12	15	ATJ4LC4	J4	26
ATJ15LB4	J15	5	ATJ14R1	J14	16	ATJ4LC5A	J4	26
ATJ15LB12	J15	5	ATJ14R4	J14	16	ATJ4LC6A	J4	26
ATJ15LB16	J15	5	ATJ12LB15	J12	17	ATJ4RC9	J4	26
ATJ12R4	J12	6	ATJ12LC27	J12	17	ATJ4RC10	J4	26
ATJ12LB7	J12	7	ATJ12LC28	J12	17	ATJ4LC7	J4	27
ATJ15R1	J15	7	ATJ12R8	J12	17	ATJ15LB14	J15	27
ATJ15R3	J15	7	ATJ12R9	J12	17	ATJ14R16	J14	28
ATJ15R4	J15	7	ATJ12R10	J12	17	ATJ14R17	J14	28
ATJ15R5	J15	7	ATJ14R22	J14	17	ATJ15LC26*	J15	28
ATJ15RC24	J15	7	ATJ15R12	J15	17	ATJ14LC19*	J14	29
ATJ4R3	J4	8	ATJ12LC22	J12	18	ATJ14LC20*	J14	29
ATJ12LB19	J12	8	ATJ12LC24	J12	18	ATJ14R13	J14	29
ATJ14LC22	J14	8	ATJ12RC14	J12	18	ATJ14R14	J14	29
ATJ15LB9	J15	8	ATJ12RC15	J12	18	ATJ14R19	J14	29
ATJ15R2	J15	8	ATJ12RC16	J12	18	ATJ15LC22*	J15	29
ATJ12LB4	J12	9				ATJ15LC25	J15	29
ATJ15LC23	J15	9						
ATJ12LB16	J12	10						
ATJ14R3	J14	10						

Tabela 6: Descrição dos grupos a que cada fragmento diferencial da linhagem 4219 pertence, após análise realizada pelo programa *Gene Cluster*. Assinalados com asterisco, os fragmentos seqüenciados.

Fragmento	Primer	Grupo	Fragmento	Primer	Grupo	Fragmento	Primer	Grupo
42J15LC19	J15	0	42J12LB14	J12	5	42J12R4	J12	11
42J15RC8*	J15	0	42J12LB17	J12	5	42J12R5	J12	11
42J15RC14*	J15	0	42J12LB18	J12	5	42J12R6	J12	11
42J14LC27	J14	1	42J15LB7	J15	5	42J12R7	J12	11
42J4RC14	J4	2	42J4RC26	J4	6	42J14LC23	J14	11
42J4RC22	J4	2	42J4RC31	J4	6	42J15LC20	J15	12
42J4RC23	J4	2	42J4RC32	J4	6	42J12R1	J12	13
42J4RC24	J4	2	42J4RC33	J4	6	42J12RC8	J12	13
42J4RC25	J4	2	42J15LC12	J15	7	42J12RC9	J12	13
42J4RC27	J4	2	42J15LC13*	J15	7	42J12RC10	J12	13
42J4RC30	J4	2	42J15LC14*	J15	7	42J4LC4	J4	14
42J15LB8	J15	2	42J15LC15	J15	7	42J14R2	J14	14
42J12LB1	J12	3	42J15LC16*	J15	7	42J14R3	J14	14
42J12LB2	J12	3	42J15LC17*	J15	7	42J14R4	J14	14
42J12LB4	J12	3	42J4RC18*	J4	8	42J14R5	J14	14
42J12LB9	J12	3	42J4RC19*	J4	8	42J14R25	J14	14
42J12LB22	J12	3	42J12LB6	J12	8	42J14RC24	J14	14
42J12LB24	J12	3	42J12LB7	J12	8	42J4LC5	J4	15
42J12LC31	J12	3	42J12LB11	J12	8	42J14LC19	J14	15
42J15LB3	J15	3	42J4LB1	J4	9	42J14LC20	J14	15
42J15LB4	J15	3	42J4LC2	J4	9	42J14LC21	J14	15
42J15LB5	J15	3	42J4LC3	J4	9	42J14LC22	J14	15
42J15LB6	J15	3	42J4R1	J4	9	42J14LC28	J14	15
42J12LB8	J12	4	42J4R2	J4	9	42J14R8	J14	15
42J12LB10	J12	4	42J4R4	J4	9	42J14R10	J14	15
42J12LB15	J12	4	42J4RC15	J4	9	42J14RC17	J14	15
42J12LB16	J12	4	42J4RC17	J4	9	42J14RC22	J14	15
42J12LB20	J12	4	42J4RC20	J4	9	42J12R2	J12	16
42J12LB21	J12	4	42J4RC21	J4	9	42J12R3	J12	16
42J12LB23	J12	4	42J12LB28	J12	9	42J14LC26	J14	16
42J12LB25	J12	4	42J14R9	J14	9	42J14R14	J14	17
42J14R11	J14	4	42J15LC9	J15	9	42J14R15	J14	17
			42J14LC24*	J14	10	42J14R16	J14	17
			42J14LC25*	J14	10			

#### 4. Clonagem e seqüenciamento

Foram selecionados para clonagem e seqüenciamento 20 fragmentos (10 da linhagem ATCC 25922 e 10 da linhagem 4219) que apresentaram coeficientes de expressão com valores maiores ou próximos de 2, ou seja, os fragmentos mais expressos em amostras tratadas com cloro, após cultivo em LB ou água do rio Cotia. Destes 20 fragmentos, 2 não puderam ser analisados devido à problemas na obtenção de clones para as reações de seqüenciamento. As 18 seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados, utilizando-se o programa BLAST, função BLASTX versão 2.2.1. Cinco fragmentos da linhagem 4219 e 5 da linhagem ATCC 25922 não apresentaram similaridade significativa com seqüências de bancos de dados. Um resumo dos resultados do seqüenciamento dos 18 fragmentos poder ser observado na tabela 7.

O fragmento 42J4RC19 (isolado de uma amostra da linhagem 4219, tratada com cloro após cultivo em água e amplificada com o *primer* J4) apresentou similaridade de 98% com uma provável sintase de *Escherichia coli* K12 (Blattner *et al.*, 1997) (figura 28). Porém, na ausência de informações sobre os possíveis substratos desta enzima, não é possível inferir seu papel na resposta da linhagem 4219 ao estresse.

```

42J4RC19: 3  EHGFI PVMVDPTCSLLDELKPLCVVDAILAKQNLGTRADMAPVTIALGPGFTAGKDCHAV 182
              E GFIPVMVDP CSLLDELKPLCVVDAILAKQNLGTRADMAPVTIALGPGFTAGKDCHAV
Sbjct:      341 ERGFIPVMVDPACSLDELKPLCVVDAILAKQNLGTRADMAPVTIALGPGFTAGKDCHAV 400

42J4RC19: 183 IETNRGHWLGQVIYSGCAQENTGVPGNIMGHTTTRRVIRAPAASIMRSNVKLGDLVKE 353
              IETNRGHWLGQVIYSGCAQENTGVPGNIMGHTTTRRVIRAPAA IMRSNVKLGDLVKE
Sbjct:      401 IETNRGHWLGQVIYSGCAQENTGVPGNIMGHTTTRRVIRAPAAGIMRSNVKLGDLVKE 457

42J4RC19: 347 ERGDVIAWIGEHEIKAPLTGMVRGLLNDGLPVFG 448
              + GDVIAWIGEHEIKAPLTGMVRGLLNDGL V G
42J4RC19: 456 KEGDVIAWIGEHEIKAPLTGMVRGLLNDGLAVVG 489

```

Figura 28: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento 42J4RC19 e a seqüência de aminoácidos de uma provável sintase de *E. coli*, indicada como *sbjct*.

Tabela 7. Análise das seqüências dos fragmentos de RAP-PCR.

Fragmento	Tamanho (pb)	Similaridade	Porcentagem de similaridade	E value	Referência
42J4RC18	453	Sem similaridade	-----		-----
42J4RC19	448	Provável sintase de <i>Escherichia coli</i> K12	98%	1e <sup>-74</sup>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
42J14LC24	339	Provável permease (proteína do sistema de transporte) - de <i>Escherichia coli</i> K12;	98%	2e <sup>-59</sup>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
		Provável proteína de transporte da família MFS de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2	83%	1e <sup>-45</sup>	McClelland <i>et al.</i> , 2001
42J15LC13	368	Sem similaridade	-----		-----
42J15LC16	349	Sem similaridade	-----		-----
42J15LC17	328	Sem similaridade	-----		-----
42J15RC8	731	Orotato fosforibosiltransferase de <i>Escherichia coli</i> K12	98%	3e <sup>-33</sup>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
42J15RC14	234	Sem similaridade	-----		-----
ATJ4RC8	453	Sem similaridade	-----		-----
ATJ4RC12	325	Sem similaridade	-----		-----
ATJ12LC23	275	orf não identificada de <i>Escherichia coli</i> K12	97%	1e <sup>-15</sup>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
ATJ12LC30	285	Provável proteína TPR de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2	68%	4e <sup>-21</sup>	McClelland <i>et al.</i> , 2001
ATJ12RC17	174	Sem similaridade	-----		-----
ATJ14LC19	434	Fosfo-β-glucosidase de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	80%	3e <sup>-25</sup>	Perna <i>et al.</i> , 2001
ATJ14LC20	333	Sem similaridade			
ATJ15LC22	475	Proteína hipotética de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	82%	3e <sup>-25</sup>	Makino <i>et al.</i> , 1999
ATJ15LC26	263	Regulador positivo para síntese de cápsula ctr de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	100%	1e <sup>-11</sup>	Perna <i>et al.</i> , 2001
ATJ15RC19	377	Sem similaridade	-----		-----

O fragmento 42J14LC24 (isolado de uma amostra da linhagem 4219, tratada com cloro e amplificada com o *primer* J14) apresentou similaridade de 98% com uma provável permease de *Escherichia coli* K12 (Blattner *et al.*, 1997) (figura 29) e similaridade de 83% com uma provável proteína de transporte da família MFS de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 (McClelland *et al.*, 2001) (figura 30). Permeases da família MFS (*major facilitator superfamily*) catalisam o transporte de solutos e íons através da membrana celular e apresentam especificidade para compostos como: açúcares, metabólitos do ciclo de Krebs e ânions orgânicos e inorgânicos, entre outros, além de exportar substâncias como antibióticos (Saier Jr. & Paulsen, 2001). Foi observado que na linhagem 4219, a expressão de 42J14LC24 é aproximadamente 2 vezes maior em amostras tratadas com cloro do que em amostras cultivadas em LB. Este fragmento também é bastante expresso, porém em menor escala, em amostras cultivadas em água do rio Cotia e praticamente não se expressa em amostras tratadas com cloro após o cultivo em água.

```

42J14LC24: 8   MCCYMAFFFGILHTNNIIIIAYVFGFLTGMANSFLDAGTYP SLMEAFPRSPGTANILIKAF 187
              MCCYMAFFFGIL  TNNIIIIAYVFGFL  GMANSFLDAGTYP SLMEAFPRSPGTANILIKAF
Sbjct 1:    79   MCCYMAFFFGILQTNIIIIAYVFGFLAGMANSFLDAGTYP SLMEAFPRSPGTANILIKAF 138

42J14LC24: 188 VSSGQFLLPLIISLLVWAE LWF GWSFMIAAGIMFINALFLYRCTFPPHPG 337
              VSSGQFLLPLIISLLVWAE LWF GWSFMIAAGIMFINALFLYRCTFPPHPG
Sbjct 1:    139 VSSGQFLLPLIISLLVWAE LWF GWSFMIAAGIMFINALFLYRCTFPPHPG 188

```

Figura 29: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento 42J14LC24 e a sequência de aminoácidos de uma provável permease de *E. coli*, indicada como *sbjct 1*.

```

42J14LC24: 14   CYMAFFFGILHTNNIIIIAYVFGFLTGMANSFLDAGTYP SLMEAFPRSPGTANILIKAFVS 193
              CY+ FF GIL+   I +AY  GFL  GMANSFLDAGTYP SLMEAFPRSP  TANILIKAFVS
Sbjct 2:    81   CYLIFFIGILYAQTIFVAYACGFLAGMANSFLDAGTYP SLMEAFPRSPSTANILIKAFVS 140

42J14LC24: 194 SGQFLLPLIISLLVWAE LWF GWSFMIAAGIMFINALFLYRCTFPPHPG 337
              GQFLLP+IISLLVWA +WFGWSF++A  IM INALFL RC FPP+PG
Sbjct 2:    141 GGQFLLPIIISLLVWANMWFGWSFLLAGAIMLINALFLLRCFPFPYPG 188

```

Figura 30 Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento 42J14LC24 e a sequência de aminoácidos de uma provável proteína de transporte da família MFS de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2, indicada como *sbjct 2*.

Embora a maioria dos estudos enfoque o papel de permeases e proteínas de transporte na proteção da célula bacteriana contra antibióticos, Alexander *et al.* (1991) verificaram que de um modo geral, organismos mais resistentes a antibióticos também são mais resistentes à desinfecção, sugerindo uma relação entre estes mecanismos. Assim sendo, pode-se especular que a expressão mais acentuada do fragmento 42J14LC24 em amostras tratadas com cloro após cultivo em LB estaria relacionada com a proteção da bactéria a aplicação do desinfetante.

O fragmento 42J15RC8 (isolado de uma amostra da linhagem 4219, tratada com cloro após cultivo em água e amplificada com o *primer* J15) apresentou 98% de similaridade com a enzima orotato fosforibosiltransferase de *Escherichia coli* K12 (Blattner *et al.*, 1997) (figura 31). Esta enzima catalisa um dos passos da biossíntese *de novo* de pirimidinas e por isso, tem papel importante na síntese de ácidos nucleicos (Quinn *et al.*, 1991). O fragmento 42J15RC8 também apresentou expressão acentuada em amostras tratadas com cloro, após cultivo em LB. Na amostra cultivada em água, a expressão deste gene foi baixa e na amostra cultivada em LB, não foi detectada. É possível que a maior expressão de 42J15RC8 em amostras tratadas com cloro possa ser explicada pelo próprio modo de ação do desinfetante. O cloro, além de alterar a estrutura da membrana celular, danifica ácidos nucleicos e proteínas, e conseqüentemente, provoca alteração em todo o metabolismo celular (Bitton, 1994; McDonnel & Russell, 1999), com isso, a expressão de 42J14RC8 pode estar relacionada ao processo de restauração ou síntese de ácidos nucleicos. Não foram encontrados trabalhos que relacionem a atividade desta enzima à condições de estresse, dificultando a análise do papel da orotato fosforibosiltransferase nos tratamentos realizados neste trabalho.

```

42J15RC8: 216 MKPYQRQFIEFALSKQVLKFGFTLKSGRKSPYFFNAGLFNTGRDLALLGRFYAEALVDS 37
              MKPYQRQFIEFALSKQVLKFGFTLKSGRKSPYFFNAGLFNTGRDLALLGRFYAEALVDS
Sbjct:      1  MKPYQRQFIEFALSKQVLKFGFTLKSGRKSPYFFNAGLFNTGRDLALLGRFYAEALVDS 60

42J15RC8: 36  XIEFDLLFGPA 4
              IEFDLLFGPA
Sbjct:      61  GIEFDLLFGPA 71

```

Figura 31: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento 42J15RC8 e a sequência de aminoácidos da enzima orotato fosforibosiltransferase de *Escherichia coli* K12, indicada como *sbjct*.

O fragmento ATJ12LC23 (isolado de uma amostra da linhagem ATCC 25922, tratada com cloro após cultivo em LB e amplificada com o *primer* J12) apresentou 97% de similaridade

com uma *orf* (*open reading frame*) de *Escherichia coli* K12, não caracterizada, cuja sequência foi submetida diretamente pelo Projeto Genoma da *E. coli* K12 (Blattner *et al.*, 1997) (figura 32).

```

ATJ12LC23: 187 LRPYDVSWDENYINKTKTSLQSTGGVIEKTLSTYLMKDGLCD 318
              ++PYDVSW+ENY++K+K L+LQSTGGV+EKTLSTYLMKDGLCD
Sbjct:      163 VQPYDVSWNENYVSKSKLLTLQSTGGVVEKTLSTYLMKDGLCD 206

ATJ12LC23: 140 YYGPNAPVSVCPTRVSYARMMFHMKTISIKRKHCNRRAE*LKKRFQPI**KTANYVM 319
              Y GP++ ++CP+ VS          +   K K          ++K   K
Sbjct:      148 YQGPDSHDTICPS-VSVQPYDVSWNENYVSKSKLLTLQSTGGVVEKTLSTYLMKDGLCD 206

ATJ12LC23: 320 ASQMNEEGAYCRWVAQM 370
              ++QMNE G YCRWVAQM
Sbjct:      207 STQMNETGGYCRWVAQM 223

```

Figura 32: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento ATJ12LC23 e a sequência de aminoácidos de um *open reading frame* de *Escherichia coli* K12, indicada como *sbjct*.

O fragmento ATJ12LC30 (isolado de uma amostra da linhagem ATCC 25922, tratada com cloro e amplificada com o *primer* J12) apresentou 68% de similaridade com uma provável região TPR de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 (figura 33). Os domínios TPR (*tetratricopeptide repeat*) são constituídos por  $\alpha$ -hélices anfipáticas e anti-paralelas em uma conformação necessária à ligação entre diferentes proteínas. Os domínios TPR foram observados originalmente em levedura onde foram identificados como módulos para interação de proteínas regulatórias do ciclo celular (Hirano *et al.*, 1990). Desde então, foram identificados em proteínas relacionadas à diferentes funções, principalmente em eucariotos (Dobson *et al.*, 2001). Os domínios TPR têm importância no funcionamento de proteínas do tipo *heat shock*, proteínas relacionadas à regulação do ciclo celular (formação do complexo promotor da anáfase e dos fusos mitóticos) e repressão da transcrição (Blatch *et al.*, 1999; Dobson *et al.* 2001). Em procariotos, o domínio TPR foi caracterizado na proteína MAM22 de *Magnetospirillum magnetotacticum* (Okuda *et al.*, 1996) e na proteína Hcp de *Helicobacter pylori* que possui um sítio para ligação de penicilina (Lüthy *et al.*, 2002).

```

ATJ12LC30: 2   SRGQYDGINERYSEEGXXLSKSVYKDGKQXSVQTWYENGQKEEEKHFDEXGQLNG----W 169
              ++G+ DG  E+YSEEG  LSK+ YK+GKQ S Q+WYENG  +EE  FD  G+ +G    W
Sbjct:       194 NQGENDGTFEQYSEEGKLLSKATYKNGKQLSAQSWYENGHPKEESSFDSEGRKHGAVKEW 253

ATJ12LC30: 170 LSNG 181
              SNG
Sbjct:       254 FSNG 257

ATJ12LC30: 169 VKQWYKNGNLAKSXNYKHDILDGDSEEWY 255
              VK+W+ NG  A S  YKHD+LDGD E+WY
Sbjct:       250 VKEWFSNGKPASSKMYKHDVLDGDFEKWY 278

ATJ12LC30: 172 KQWYKNGNLAKSXNYKHDILDGDSEEW 252
              ++WY+NG+      YK+ +L+GD++ W
Sbjct:       275 EKWYENGHRESVYPYKNGMLNGDAKHW 30

```

Figura 33: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento ATJ12LC30 e a sequência de aminoácidos de uma provável região TPR de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2, indicada como *sbjct*.

A expressão do fragmento ATJ12LC30 foi detectada nas 4 condições estudadas, porém, o grau de expressão deste fragmento em amostras tratadas com cloro, cultivadas em água e tratadas com cloro após o cultivo em água foi bem maior que na amostra cultivada em LB. A expressão deste gene em amostras cultivadas em LB pode ser explicada pelo seu possível papel na regulação de atividades como a divisão celular e regulação da transcrição, porém, em situações estressantes, sua expressão seria aumentada devido a sua possível importância na estruturação de proteínas de estresse de *E. coli* (*heat shock*). Poucos estudos que relacionam os domínios TPR em procariotos são conhecidos, dificultando a elaboração de qualquer hipótese sobre o papel do fragmento ATJ12LC30 na resposta aos tratamentos estudados.

O fragmento ATJ14LC19 (isolado de uma amostra da linhagem ATCC 25922, tratada com cloro e amplificada com o *primer* J14) apresentou 80% de similaridade com uma fosfo- $\beta$ -glucosidase críptica de *Escherichia coli* O157H7 (Perna *et al.*, 2001) (figura 34). Em *E. coli* a fosfo- $\beta$ -glucosidase pode ser transcrita por 2 operons, chamados de *cel* e *bgl*, que são responsáveis pelo transporte, fosforilação e hidrólise de celobiose, arbutina e salicina (Parker & Hall, 1990). Operons similares são encontrados em *Bacillus subtilis* (LeCoq *et al.*, 1995) e *Shigella sonnei* (Kharat & Mahadevan, 2000).

```

ATJ14LC19: 96  FDIVKDVEELCPNAWVINFTNPAGMALKPLSSYR-IKRFIVGCNIPIGMKMLFR-CLMLK 269
                FDIVKDVEELCPNAWVINFTNPAGM  + + +  KRFIGVCNIPIGMKM  R  LMLK
Sbjct:      130  FDIVKDVEELCPNAWVINFTNPAGMVTEAVYRHTGFKRFIGVCNIPIGMKMFIRDVLMK 189

ATJ14LC19: 270  DSDD 281
                DSDD
Sbjct:      190  DSDD 193

ATJ14LC19: 46  TNGAGGLFKGLRTIPVI 96
                TNGAGGLFKGLRTIPVI
Sbjct:      113  TNGAGGLFKGLRTIPVI 129

```

Figura 34: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento ATJ14LC19 e a sequência de aminoácidos da fosfo- $\beta$ -glucosidase críptica de *Escherichia coli* O157H7, indicada como *sbjct*.

A expressão do fragmento ATJ14LC19 foi detectada em amostras cultivadas em LB e água e em maior escala na amostra tratada com cloro. Porém, não foi observada expressão deste fragmento na amostra tratada com cloro após cultivo em água. Foi observado que a indução da fosfo- $\beta$ -glucosidase ocorre na presença de  $\beta$ -glucosídeos e a sua repressão é regulada pela concentração dos produtos da degradação destes açúcares (Parker & Hall, 1990). Uma característica interessante dos operons *cel* e *bgl* é que se tratam de genes crípticos, ou seja, genes silenciados em linhagens selvagens e que são ativados apenas sob ocorrência de mutações ou inserção de elementos genéticos móveis (Hall *et al.*, 1983), por esta razão, Kharat & Mahadevan (1990) sugerem que estes operons devem estar em processo para ser tornarem pseudogenes devido ao acúmulo de mutações. Porém, existe a possibilidade de que o operon *bgl* tenha outras funções que não estão relacionadas à utilização de  $\beta$ -glucosídeos (Mahadevan, 1997). Droffner & Yamamoto (1992) detectaram a expressão do operon *cel* em bactérias mesofílicas como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* quando incubadas em temperaturas entre 48°C e 54°C, sugerindo um papel do estresse na ativação destes genes, normalmente silenciados. A identificação de outras funções que poderiam estar relacionadas a este operon pode auxiliar a compreensão do papel da enzima fosfo- $\beta$ -glucosidase nas condições estudadas neste trabalho.

O fragmento ATJ15LC26 (isolado da linhagem ATCC 25922, tratada com cloro após cultivo em LB e amplificada com o *primer* J15) apresentou 100% de similaridade com o gene *rcaA* de *Escherichia coli* O157:H7 (Perna *et al.*, 2001) (figura 35), que está relacionado à

regulação da síntese da cápsula polissacarídea extracelular (Keenleyside *et al.*, 1992). São conhecidos 2 tipos de cápsula polissacarídea: o ácido colânico, encontrado em *E. coli* K12 e em O157: H7 e os antígenos K, detectados em *E. coli* K30, *Erwinia* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Keenleyside *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2000). A função atribuída à cápsula polissacarídea é a de proteger fisicamente a célula bacteriana contra estresses ambientais e contra mecanismos de defesa do hospedeiro, como a fagocitose (Keenleyside *et al.*, 1992).

```

ATJ15LC26: 158 QVIYHVVRLTDNVTNGIFVNMR 93
              QVIYHVVRLTDNVTNGIFVNMR
Sbjct:      186 QVIYHVVRLTDNVTNGIFVNMR 207

ATJ15LC26: 229 QMNIKASR-SSHKGNIKRKIKAHNNRL 152
              QMNIKA  SSKHGNIKRKIK HN ++
Sbjct:      161 QMNIKAKTVSSHKGNIKRKIKTHNKQV 187

```

Figura 35: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento ATJ14LC19 e a sequência de aminoácidos de RcsA de *Escherichia coli* O157:H7, indicada como *sbjct*.

Em *Vibrio cholerae* foi detectado o fenótipo rugoso, caracterizado pela produção de um exopolissacarídeo chamado EPS<sup>ETr</sup>. Estes polissacarídeos conferem maior resistência ao tratamento com cloro e promovem a formação de biofilmes, sem que haja perda da patogenicidade e provavelmente, conferem maior resistência ao estresse ambiental (Yildiz & Schoolnik, 1999).

A proteína RcsA pertence à família de ativadores de transcrição denominada LuxR, que está relacionada ao controle de repostas à estímulos ambientais (alteração de temperatura, concentração de sais e de fontes de carbono) (Stout *et al.*, 1991; Mao *et al.*, 2001). O aumento da expressão de *rcsA* em amostras tratadas com cloro pode ser explicado pela necessidade da célula em sintetizar os constituintes da cápsula polissacarídea com maior intensidade para proteger a membrana celular da ação do cloro.

O fragmento ATJ15LC22 (isolado da linhagem ATCC 25922 tratada com cloro após cultivo em LB e amplificada utilizando-se o *primer* J15) apresentou 82% de similaridade com uma proteína hipotética de *Escherichia coli* O157:H7 (Makino *et al.*, 1999) (figura 36), porém,

não foram encontradas maiores informações que pudessem indicar qual seria o seu papel na resposta ao estresse.

```

ATJ15LC22:  49  GKRRPHXLIKQGAILVTEPXEILXNLQFGLHWLPDAPENHF 171
              G   PH LIKQGAILVTEP EIL NLQFGLHWLPDAPEN F
Sbjct:      258 GSEGPHWLIKQGAILVTEPEEILENLQFGLHWLPDAPENSF 298

ATJ15LC22: 156 P*KSFYSPDQEDVALPFLS-SANVGDEVT 239
              P  SFYSPDQEDVALPF  ANVGDEVT
Sbjct:      294 PENSFYSPDQEDVALPPELLANVGDEVT 322

ATJ15LC22:  8   GREXFAXPGPIGNPGSEG 61
              GRE FA PGPIGNPGSEG
Sbjct:      244 GREVFALPGPIGNPGSEG 261

```

Figura 36: Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos do fragmento ATJ14LC19 e a sequência de aminoácidos de uma proteína hipotética de *Escherichia coli* O157:H7, indicada como *sbjct*.

Dos 18 fragmentos sequenciados, 10 não apresentaram similaridade com sequências disponíveis em banco de dados, indicando que apesar do sequenciamento completo do genoma da *Escherichia coli* K12 e O157:H7, muito ainda deve ser elucidado sobre a função dos genes e seus papéis nas vias metabólicas em diferentes linhagens de *E. coli*. Porém, o tamanho reduzido de alguns fragmentos analisados (por volta de 200-300 pares de bases) pode ter dificultado a identificação destas sequências. Até o momento não existem trabalhos que enfoquem os aspectos moleculares da resposta de *E. coli* ao tratamento com cloro após ser submetida a estresse em ambiente poluído. É comum a existência de microrganismos estressados pela permanência no ambiente, por isso, a caracterização da resposta de *E. coli* ao cloro após estresse ambiental pode ampliar os conhecimentos sobre as alterações sofridas por esta bactéria durante o tratamento de água.

## **CONCLUSÕES**

1. A curva de sobrevivência da linhagem ATCC 25922 sob tratamento com 10 mg/L de cloro mostrou uma drástica redução no número de UFC (unidades formadoras de colônia) nos primeiros 5 minutos de tratamento e, após este período, a redução da população prosseguiu de maneira mais gradual. Já a linhagem 4219 apresentou uma redução de aproximadamente 50% de sua população nos 5 primeiros minutos de tratamento, mas após este período, o número de UFC se estabilizou, indicando que esta linhagem apresenta estratégia distinta de ATCC 25922 para responder a este estresse;
2. As curvas de sobrevivência da linhagem ATCC 25922 e da linhagem 4219 cultivadas em água do rio Cotia indicou que após 3 dias nestas condições ocorre redução acentuada do número de UFC para as duas amostras, sendo que para a linhagem ATCC 25922 esta redução ocorre de maneira praticamente constante e para a linhagem 4219 ocorre de maneira mais lenta nos 2 primeiros dias e bruscamente entre o segundo e terceiro dias;
3. As curvas de sobrevivência da linhagem ATCC 25922 e da linhagem 4219 tratadas com cloro após cultivo em água indicou que não há diferenças entre estas duas linhagens quanto ao padrão de sobrevivência neste tratamento. Esta análise também sugere que o estresse ambiental (cultivo em água) provoca o aumento da sensibilidade da linhagem 4219 ao desinfetante;
4. Os experimentos de RAP-PCR foram eficientes para detecção de genes expressos diferencialmente nas 4 condições estudadas (cultivo em LB, tratamento com cloro, cultivo em água e tratamento com cloro após cultivo em água);
5. Um total de 351 fragmentos diferenciais foram isolados dos géis de RAP-PCR, destes, 286 foram analisados por *slot blot* e 224 (aproximadamente 78%) tiveram expressão diferencial confirmada;
6. A análise de todos os fragmentos que tiveram expressão diferencial confirmada indicou que o padrão de expressão de amostras tratadas com cloro difere do padrão de amostras tratadas com o desinfetante após cultivo em água, sugerindo influência do estresse ambiental;

7. Dos 8 fragmentos seqüenciados da linhagem 4219, 3 apresentaram similaridade com: 1) uma provável permease de *Escherichia coli* K12; 2) uma provável sintase de *Escherichia coli* K12; 3) a enzima orotato fosforibosiltransferase, também de *E. coli* K12;

8. Dos 10 fragmentos seqüenciados da linhagem ATCC 25922, 2 apresentaram similaridade com seqüências depositadas em banco de dados, mas que ainda não foram caracterizadas e 3 fragmentos isolados de amostras tratadas com cloro apresentaram similaridade com: (1) uma provável proteína TPR de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2, (2) uma fosfo- $\beta$ -glucosidase críptica de *E. coli* K12, (3) RcsA, um regulador da síntese da cápsula polissacarídea de *E. coli* O157:H7;

9. Nenhum dos fragmentos seqüenciados da linhagem ATCC 25922 apresentou similaridade com seqüências isoladas da linhagem 4219. Do mesmo modo, nenhum dos fragmentos seqüenciados da linhagem 4219 apresentou similaridade com seqüências da linhagem ATCC 25922, indicando que há diferenças na resposta das duas linhagens aos mesmos tratamentos.

## **APÊNDICE**

## Seqüência de nucleotídeos obtidas de produtos de RAP-PCR em resposta ao cloro

1. Seqüências nucleotídicas correspondem aos produtos de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 induzidos por cloro após cultivo em LB. Estas seqüências estão apresentadas no formato FASTA.

### > ATJ12LC23

```
GTCCCGTGGTTAGTGAGTATCAGAGCCACCAGCCAGGTTGTGGGTCGGTTCTGTTGATAAAGATATCTATTATGGACCAAATGCACC
CGTGTCGGTGTGCCCAACCCGTGTGAGTTACGCCCGTATGATGTTTCATGGGATGAAACTATATCAATAAACGAAAACACTGTCT
TTGCAATCGACGGGCGGAGTAATTGAAAAACGCTTTC AACCTATCTGATGAAAGACGGCAAACATATGTGATGGCCTCGCAAATGAA
TGAAGAGGGCGCTT
```

### > ATJ12LC30

```
GTCCCGTGGTCAGTATGATGGAATTAACGAACGTTATAGTGAGGAGGGTANGNTACTGTCTAAATCCGTCTATAAAGACGGAAAAACA
AATNTCTGTTCAAACCTGGTATGAAAATGGGCAGAAAGAAGAGGAGAAACATTTTGATGAGCANGGCCAATTAAATGGTTGGTTAAG
CAATGGTATAAAAATGGAATCTTGCAAAATCACANAACATATAACATGACATACTCGATGGTGATAGTGAAGAGTGGTACCACGGG
ACA
```

### > ATJ14LC19

```
CACCCGGATGAACGTATTCATTAAGTCATGGTTATCTTGTGAGGAACCTAACGGCGCGGGCGGTCTGTTTTAAAGGTCTGCGTACCATT
CCGGTGATTTTGACATCGTAAAAGATGTGGAAGAACTATGTCCGAATGCATGGGTGATTAACTTCACTAACCCGGCGGGAATGGCAC
TGAAGCCGTTATCGTCATACCGGATTAAACGCTTTATCGGCGTGTGTAATATCCGATCGGCATGAAGATGTTATCCGATGTCTGA
TGCTGAAAGACAGCGATGATTATTATCGATCTGTCGNCCTCACCATATGGTGTGATTAAGGATGGCTGTAAATGGCAAACACGCTTT
CGGAATGCTTNTGGGTGCATCCGGTGAATACTAGTGAATCGCGGCCGCTGAGGCGACNTATGGAGANTCCACGCGTGATCTACTGA
```

### > ATJ14LC20

```
CACCCGGATGAGTATTTCAGGAGAAAAGCGACACAAAACAGGAAAAAGTTTGCCGCACAGCAACGAAATTTTTCATTTCAGCAGGTGG
TGTGATGACGAATGTGAAGGGAGTCAAAGAGTGGCATACAGCAACAAATTTTTTGATGCTGTATGGTTTTGAGAATAAAAAATCGT
TGAAATGTGTGAGCTTAATCATCAGATTAGCGACTATGGCGTTACTTTTAACACCATACTGTGTAAACCATTCCAACATTCGCTGCC
AGCCGCTTTCGCAGATCGGCATGATAGCTCGGGCGATAATCGGCCTTGAACCATGCCTGCATCCGGTGAATA
```

### > ATJ15LC22

```
TGTAGCAGGGCGTGAAGNTTTTGCTTNGCCAGGACCAATAGGGAATCCGGGAAGCGAAGGCCTCACTGNNTAATAAAACAAGGTGCG
ATTCTTGTGACGGAACCGNAAGAAATCTGANAACCTTGCAATTTGGATTGCACTGGTTGCCAGACGCCCTGAAAATCATTTTATT
CACCAGATCAGGAAGACGTGGCATTGCCATTTCTGAGCTCTGCTAACGTAGGAGATGAGGTAACACCTGTTGACGTCGTCGCTGAAC
GTCCGCCACCTGTGCCAGAGGTAGNTACTCACTACTCGAACTGGAGTAGCAGGATGGATCGCAGCTGACCCGGCGGTATGTCCGATG
AGGAGGCATGCATGTCNCGACTAATGTATTGGTNGAACCTATATTCACACAGAGCTGAGTGCGTGTGATAAGACAACTTGACAGGA
TCTNCGCGCAGATTGATGAAAAAATTACATNCTGTCAATA
```

### > ATJ15LC26

```
TGTAGCAGGGCATCAGGACGGTATCTTTGTTGAGAAAGCAGAGTAATCTTATTACGCCCTGACTGGTGGGAAACCACCAGTCAGAATG
TGTTAGCGCATGTTGACAAAAATACCATTAGTCACATTATCCGTGAGTCGGACGACATGGTAGATAACCTGTTTATTATGCGTTTTG
ATCTTACGTTTAAATATTACCTTTATGCGATGAAACGGTCTTGGCTTTGATATTCAATTTGGTGGGAGATTTGAATGGTTCCTGCTAC
AA
```

2. Sequências nucleotídicas correspondem aos produtos de RAP-PCR da linhagem ATCC 25922 induzidos por cloro após cultivo em água. Estas sequências estão apresentadas no formato FASTA.

> **ATJ4RC8**

CCGAACACGGCGCAGCAAGGGGAAGCAAGCAGATGTTTGAAGTGTATGCAGATGGCCCCAGCAGGCGCAGCCAGTGCAGCGCAT  
CAGAGCGACGGACGGAAGGGAAGAGCGCTGAGAGACCCAGGGAGAGGGACAGAGGGATGTTGTGTGTGGGGGTGGACGCTGACCTC  
ATATCGTTCATCGCGTGGGAATGCTTCTACACGCCTGGTGTACCTGCACCAGATGTTATTCCCATCGTCATCAAAACACAAAACC  
AAACGG

> **ATJ4RC12**

CCGAACACGGAACGGTATAGTCATCACCAACTTTCTTCTGTAAACATTTCTGTTTCATCAATGACATGCGATATTTACGACAGGATAT  
AATTGGAATTCCTGTCTTTCAAAGTAATCGATGGATTTATCCCTTGAAGAAGTATGACTAACTAGTTTGTAGCTTCTTTCTTGAC  
ATTGATAATATTGTTTACAGATAACTATTGCTTATGGAGTCAATCAGATTGAATCAAACAATGAGCATGATTANAGAGATTGAAC  
AAGCGTCGA

> **ATJ12RC17**

GTCCCGTGGTAAAAGCAGCAAACGCGTTTCTTGTGTTTCCAGTCTTTTTGCTGCTGAAACATCGGGTAATCTGCCTCTTAACCAG  
TAAATCGTTTTTAAGCGTGCCTGACACAACGCTGCGACAGTAGCGTATTGTGGCACAAAAATAGACACACCGGGAGTTCATCATGA  
CCTTAGAATGGTGGTTGCCTACCTGCTGACATCGATCATTTAAGCCTGTGCGAGCTCTGGCGCAATCAACACCATGACCACCTCGCT  
CAACCACGGGACA

> **ATJ15RC19**

GTAGCAGGGAGATATCAATGGTCTTCTGGATTTGATGGCCAGCCGAAGCGGTCTGTACTGGCGCATGGATAATGGTCGGATTGTATT  
CTATCTGACTGAAACCAGAACGTATCCACTTCATATGCTGAACACTAAACCAGCAGCAGTTCCAGCGTCAGCTCTGCTCAACAAGC  
ACAATGGGGGCAACAGGAGGCCAGGATAACTCAGCATCCGGTGATGCTACGTCCTCTCAGAGCACAAACCGTCGGTCAGGAATACGAC  
CTGTATGAAGACATCCGGAAAACCTATTGAAGCGATGCTGCACCAGAAAAGGCCGTACTGGTTATCTGCATCGAGCTAACGCTAAC  
GTCACTGANCTCTGCTGTCAGAAGCCGCG

3. Sequências nucleotídicas correspondem aos produtos de RAP-PCR da linhagem 4219 induzidos por cloro após cultivo em LB. Estas sequências estão apresentadas no formato FASTA.

> **42J15LC16**

TGTAGCAGGGCTGATGGTTTTTGAGCAGGGTTATGATTGCAATGTATTAGGGATAACAGAGGAAGGCAAAAAAGCCAAAGTCTGGA  
GCACAACAGACGGTGCCTGTGTTGGTCTGCTGCTGTTGACGAGATTAAGGAATGGACTGAGCCGGGAAACGGTAATCAGAAAGTAG  
TTCGCGTGACTTATACGTGGAAGCTGGTTGACGTTCCGGGCTGGATTGACAAAAAGCCTTCGCCAGCGTTAAAGGGATGAATGAAC  
CTGCTGATAGTGCCATGAATTTAGTTAAGACCAGTAATGGTTGGAAAGCTAACTAAAAGGATGCTGGATCAAAATGCCCTGCTACA  
A

> **42J15LC13**

TGTAGCAGGGGTACAAGGACGCCGCGCCAGCCGATCGCCGATCGTCAAAGAGCGGTTATGTGGTATGGCGCCATTACCAAAATAAA  
AATGACCGTTCACAGCCCTGGCAACTGTTCTTTCCATGATGTTAATGATGGCAGATTCTATGGTGAATTCGCTGCCGCAAGTA  
TCCGCACTGAATTTAGGGCTTCTCCCATTTGGTAGTGTGTTGGTATGAAGGAAGGATGGTTTACAGGCTAGATTCATGACAAAGCNA  
TTCAAGGTTGATTTTTACATCGCGGGTGGAAATACTACACCTTAAATGGAGACAAAGAGCCTTTAGTTCCACCCAATGTTTATCCT  
CTGTTCTACCCCTGCTACAACGATCGGCTGGCCGGGGCGTCTTGCGGCCCTGCTACAAATNACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCCA  
GGTCGACCATATGGGGAAGCTCCNCGCGTGGGTGCANNCTTGGGATTTCTTNNGGGGGCCAAAANNNGGG

> **42J15LC17**

TGTAGCAGGGTTATGATTGCAATGTATTAGGGATAACAGAGGAAGGCAAAAAAGCCAAAGTCTGGAGCACAACAGACGGTGCCTGTG  
TTGGTCTGCTGCTGTTGACGAGATTAAGGAATGGACTGAGCCGGGAAACGGTAATCAGAAAGTAGTTCGCGTGACTTATACGTGGA  
AGCTGGTTGACGTTCCGGGCTGGATTGACAAAAAGCCTTCGCCAGCGTTAAAGGGATGAATGAACCTGCTGATAGTGCCATGAATT  
TAGTTAAGACCAGTAATGGTTGGAAAGCTAACTAAAAGGATGCTGGATCAAAATGCCCTGCTACAA

4. Sequências nucleotídicas correspondem aos produtos de RAP-PCR da linhagem 4219 induzidos por cloro após cultivo em água. Estas sequências estão apresentadas no formato FASTA.

**> 42J4RC18**

```
CCGAACACGGCGCAGCAAGGGGAACCTCAAGCAGATGTTTGAACCTGTTTATGCAGATGGCCCCAGCAGGCGCAGCCAGTGCAGCGCAT
CAGAGCGACGGACGGGAAGGAAGGCGCTGAGAGACCCAGGGAGAGGGGACAGAGGGATGTTGTGTGTGGGGGTGGACGCTGACCT
CATATCGTTTCATCGCGTGGGGAATGCTTCTACACGCCCTGGTGTACCTGCACCAGATGTTATTCCCATCGTCATCAAAACACAAAAC
CAAACGGATTACGTGTCTTCTTTGTTTCAGAGATGGCTCCACATCTCAGGTGGTGTGCGTCGTAGGAACACTGCATCCATCTTTGAA
AATATGTTTTCTACCCACGACAGTAGTACTCTTTTTTTTTCGAAACACAAAGTGTCAGGTATCTGGAAGATCCATCCAAATTTATTT
CGACCGTCCGTGTTTCGGA
```

**> 42J4RC19**

```
CCGAACACGGATTTCATCCCTGTGATGGTAGATCCACCTGTTTCATTGCTTGATGAACTGAAACCGCTTTGCGTGGTGGACGCTATTC
TGGCGAAACAGAAATTTGGGAACGCGGGCAGATATGGCACCCAGTAACAATCGCGCTTGGGCCGGGCTTTACTGCAGGGAAGGATTTGTC
ATGCCGTAAATTGAAACAAATCGCGGGCACTGGCTCGGTCAGGTGATTTACTCTGGTTGTGCGCAGGAGAATACCGGTGTTCCCGGCA
ATATTATGGGGCATAACACCCGACGAGTGATCCGTGCTCCTGCTGCAAGCATTATGCGATCCAACGTGAAATTAGGCGATCTGGTGA
AAGAGGCGATGTGATTGCCTGGATTGGTGAGCATGAAATTAAAGCACCGTTGACGGGGATGGTGCCTGGCTTGTGTAACGACGGACT
GCCCCGTGTTTCGGA
```

**> 42J15RC8**

```
TGTAGCAGGGCCAAACAGCAGATCGAACTCAATGNCGGAATCCACCAATGCTTCAGCGTAAAAACGGCCTAACAGTGCCAGATCGCG
CCCCGTATTAAACAGCCCCGGCGTTGAAGAAATAGGGGCTTTTGCGCCCGGACTTCAACGTAAACTCGCCAAACTTTAACACCTGCTT
GCTAAGCGCAAATTCATAAACTGGCGCTGATATGGTTTCATGCTTCGCTCCTCATCTTACTTTTCTACAGACAAAAAAGGCGA
CTCATCAGTCGCCTTAAAAATCAGTTTGCCAGCGCCGCCCTTCTGCGTCGCTACAATGGATTGCGATTCCCCCTCGGGCCAGCGCCAAC
AAGGTGAGTAATTCCTCGTGGGTGAAACGGTTCGCCCTTTGGCCGTCCCTTGCACTTTAATGATCGCCGNTTCGGCATNATTACGTT
AATGTCGGGCTNNTGCGGCTGAGTCTNAACGATTCAAAATCGCAACCTTTNNNCCGTTGACATGCCGAAGAACTGGGGNTACCAT
CCTTTGGGGGNGGGGTTTANGTNGCCGNTTCNCANCTTTTGANGGATTGCAAGCCAGCAGGACCGAATAAACGGAAACNCGGGCCNC
ATAACGNCGNNNNNNNNANACGNNAANAGGGAACTNCCCGGNTTTAAATTATTTTGGCAAAANGGGCAAAAACCTTGNTTCATTG
GGNCCNCCTGTCAAAAANAGGATTGNGCCCCNGGG
```

**> 42J15RC14**

```
TGTAGCAGGGTAGTAGATAAATTTAGACAACAAAAACCCACCAACCTTGAACCGAAATGGCGGGGTTGATGGGCTCCACAAAATG
GGGACATCAAAGAAAAGCAGTGGCACTAATTAAGACTGATGCCCTGCGGAAAAGTTCTGCGGTTGTGCAAAAAAATTTCAATTTTCAG
GGCAACTTCAGTTTTATCCTAATCCTGGCCATACCATGACGATGATTGTCCCTGCTACAA
```

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aieta, E. M.; Berg, J. D. (1986) A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. **J. Am. Water Works Assoc.** 78: 62-72.
- Alexander, D. M.; Jeawon, R. H.; Persad, S. (1991) Disinfection resistance in antibiotic resistant organisms. **South. African Journal of Science** 87: 614-617.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Res.** 25: 3389-3402.
- Akashi, S.; Joh, K.; Tsuji, A. (1994) A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. **Eur. J. Pediatr.** 153: 650-655.
- Arsène, F.; Tomoyasu, T.; Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. **Int. J. Food-Microbiol.** 55: 3-9
- Auty, M. A.; Gardiner, G.E.; McBrearty, S. J.; O'Sullivan, E. O.; Mulvihill, D.M.; Collins, J. K.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C.; Ross, R. P. (2001) Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. **Appl Environ Microbiol** 67(1):420-425.
- Bates, A. J. (2000) Water as consumed and its impact on the consumer - do we understand the variables?. **Food Chem. Toxicol.** 38: S29-S36.
- Benson, N. R.; Wong, R. M.; McClelland, M. (2000) Analysis of the SOS response in *Salmonella enterica* serovar typhimurium using RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. **J. Bacteriol.** 182(12): 3490-3497.
- Berg J.; Aieta, E. M.; Roberts, P. V. (1979) **Effectiveness of chlorine dioxide as a wastewater disinfectant. Progress in Wastewater Technology**, Proceedings of the National Symposium, Cincinnati, Ohio, September 1978, A. D. Venosa (ed.). EPA- 600/9-018, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.
- Berg, J. D.; Matin, A.; Roberts, P. V. (1982) Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 814-819.
- Berg, J. D.; Roberts, P. V.; Matin, A. (1986) Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. **J. Appl. Bacteriol.** 29:186-194.
- Beuchat, L. R. (1999) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **J. Food Protect.** 62(8): 845-849.
- Bissonnette, G. K. (1974) **Recovery characteristics of bacteria injured in the natural aquatic environment** (Ph.D. thesis), Montana State University, Bozeman, Montana. 161 pp.
- Bitton, G. (1994) **Wastewater microbiology**. pp 83, 101, 102, 113-134. 1ª edição Wiley-Liss New York.
- Blatch, G. L.; Lassel, M. (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. **Bioessays** 21(11): 932-939.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G. III; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V. *et al.*, (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. **Science** 277(5331): 1454-1474.
- Bopp, C. A.; Brenner, F. W.; Wells, J. G.; Strockbine, N. A. (1999) *Escherichia, Shigella and Salmonella*. pp 459-465. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. (ed) **Manual of clinical microbiology**. ASM Press, Washington D. C.

- Boulos, L.; Prévost, M.; Barbeau, B.; Coallier, J.; Desjardins, R. (1999) LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **J. Microbiol. Rev.** **37**: 77-86.
- Bukau, B.; Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell** **92**: 351-366.
- Camper, A. K.; McFeters, G. A. (1979) Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** **31**: 663-641.
- Center for Biofilm Engineering. (1994) Biofilm Heterogeneity. **Center for Biofilm Engineering News. Montana State Univ.** **2**(1): 1-2.
- Centers for Disease Control (1997) Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts – Michigan and Virginia, June-July 1997. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.** **46**: 741-744.
- CETESB (2001) Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. pp 81-86.
- CETESB (1999) Significado sanitário dos parâmetros de qualidade selecionados para utilização na rede de monitoramento. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo ([www.cetesb.br/QualidadeRios/anexo1.htm](http://www.cetesb.br/QualidadeRios/anexo1.htm))
- Chakraborty, A.; Das, S.; Majumdar, S.; Mukhopadhyay, K.; Roychoudhury, S.; Chaudhuri, K. (2000) Use of RNA arbitrarily primed-PCR fingerprinting to identify *Vibrio cholerae* genes differentially expressed in the host following infection. **Infect. Immun.** **68**(7): 3878-3887.
- Chapman, P. A.; Siddons, C. A.; Malo, A. T. C.; Harkin, M. A. (1997) A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs, and poultry. **Epidemiol. Infect.** **119**: 245-250.
- Characklis, W. G.; Marshall, K. C. (1990) **Biofilms**. John Wiley & Sons. Inc, New York.
- Chaiyanan, S.; Huq, A.; Mangel, T.; Colwell, R., R. (2001) Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Syst. Appl. Microbiol.** **24**(3): 331-341.
- Cheville, A. M.; Arnold, K. W.; Buchrieser, C.; Cheng, C. M.; Kaspar, C. W. (1996) *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Appl. Environ. Microbiol.** **62**: 1822-1824.
- Chia, J. S.; Lee, Y. Y.; Huang, P. T.; Chen, J. Y. (2001) Identification of stress responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. **Infect. Immun.** **69**(4): 2493-2501.
- Condie, L. W. (1986) Toxicological problems associated with chlorine dioxide. **J. Am Water Works Assoc.** **78**: 73-78.
- Corton, J. C.; Gustafsson, J. A. (1997) Increased efficiency in screening large numbers of cDNA fragments generated by differential display. **Biotechniques** **22**(5): 802-810.
- Dartigalongue, C.; Missiakas, D.; Raina, S. (2001) Characterization of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  regulon. **J. Biol. Chem.** **276**(24): 20866-20875.
- Delihias, N.; Forst, S. (2001) MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. **J. Mol. Biol.** **313**: 1-12.
- Dingman, D. W. (2000) Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest and source. **Appl. Environ. Microbiol.** **66**(3): 1077-1083.

- Dobrindt, U.; Blum-Oehler, G.; Hartsch, T.; Gottschalk, G.; Ron, E. Z.; Funfstuck R. (2001) S-fimbria-encoding determinant *sfa(I)* is located on pathogenicity island III 536 of uropathogenic *Escherichia coli* 536. **Infect. Immun.** **69**: 4248-4256.
- Dobson, S.; Kar, B.; Kumar, R.; Adams, B.; Barik, S. (2001) A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **BMC Microbiol.** **1**(1):31-39.
- Domek, M. J.; LeChevallier, M. W.; Cameron, S. C.; McFeters, G. A. (1984) Evidence for the role of copper in the injury process of coliforms in drinking water. **Appl. Environ. Microbiol.** **48**: 289-293.
- Dukan, S.; Lévi, Y.; Touati, D. (1997) Recovery of culturability of an HOCl-stressed population of *Escherichia coli* after incubation in phosphate buffer: resuscitation or regrowth? **Appl. Environ. Microbiol.** **63**(11):4204-4209.
- Eaton, J. W.; Kolpin, C. F.; Swofford, H. S. (1973) Chlorinated urban water: a cause of dialysis-induced hemolytic anemia. **Science** **181**: 463-464.
- Edberg, S. C.; Rice, E. W.; Karlin, R. J.; Allen, M. J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **Journal of Applied Microbiology** **88**: 106S-116S
- Eisen, M. B.; Spellman, P. T. Brown, P. O.; Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome wide expression patterns. **PNAS** **95**: 14863-14868.
- Espinosa-Urgel, M.; Kolter, R. (1998) *Escherichia coli* genes expressed preferentially in an aquatic environment. **Mol. Microbiol.** **28**(2): 325-332.
- Fiksdal, L.; Pommepuy, M.; Caprais, M.; Midttun, I. (1994) Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**(5): 1581-1584.
- Fujioka, R. S.; Narikawa, O. T. (1982) Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** **44**: 395-401.
- Gardiner, G. E.; O'Sullivan, E.; Kelly, J.; Auty, M.A.; Fitzgerald, G.F.; Collins, J.K.; Ross, R. P.; Stanton, C. (2000) Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Appl Environ Microbiol** **66**(6): 2605-12
- Gasch, A. P.; Spellman, P. T.; Kao, C. M.; Carmel-Harel, O.; Eisen, M. B.; Storz, G.; Botstein, D.; Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol. Biol. Cell** **12**: 4241-4257.
- Gill, R. T.; Valdes, J. J.; Bentley, W. E. (1999) Reverse transcription-PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. **Appl. Environ. Microbiol.** **65**: 5386-5393.
- Gray, T. R. G. (1976) Survival of vegetative microbes in soil. **Symp. Soc. Gen. Microbiol.** **26**: 327-364.
- Grimshaw, J. P. A.; Jelesarov, I.; Schönfeld, H.; Christen, P. (2001) Reversible thermal transition in GrpE, the nucleotide exchange factor of the DnaK heat-shock system. **J. Biol. Chem.** **276**(9): 6098-6104.
- Griehle, H. C.; Colton, F. R.; Bird, T. J. (1970) Fine-particle humidifiers: source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a respiratory disease unit. **New Engl. J. Med.** **282**: 531-535.
- Griffin, P. M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. pp739-761 In Blaser, M. J.; Smith, P. D.; Ravdin, J. I.; Greenberg, H. B.; Guerrant, R. L. (eds) **Infections of the gastrointestinal tract**. Raven Press, New York

- Haas, C. N.; Engelbrecht, R. S. (1980) Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from chlorination. **J. Water Pollut. Control. Fed.** **52**:1976-1989.
- Hackney, C. R.; Bissonnette, G. K. (1978) Recovery of indicator bacteria on selective media. **J. Appl. Bacteriol.** **37**: 45-57.
- Hall, B.G.; Yokoyama, S.; Calhoun, D. H. (1983) Role of cryptic genes in microbial evolution. **Mol Biol. Evol.** **1**(1): 109-124.
- Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Rice, D. H.; Ebel, E. D.; Herriott, D. E.; Carpenter, L. V. (1998) Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern United States. **Preventive Veterinary Med.** **35**: 11-19.
- Harakeh, M. S.; Berg, J. D.; Hoff, J. C.; Matin, A. (1985) Susceptibility of chemostat-grown *Yersinia enterocolitica* and *Klebsiella pneumoniae* to chlorine dioxide. **Appl. Environ. Microbiol.** **49**: 69-72.
- Hartke, A.; Giard, J.; Laplace, J.; Auffray, Y. (1998) Survival of *Enterococcus faecalis* in a oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. **Appl. Environ. Microbiol.** **64**: 4238-4245.
- Hengge-Aronis, R. (1993) The role of *rpoS* in early stationary-phase gene regulation in *Escherichia coli* K12. In: Kjelleberg, S. (Ed.). **Starvation in bacteria**, Plenum Press, New York, pp. 171-200.
- Hecker, M.; Völker, U. (1998) Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the  $\sigma^B$  regulon. **Mol. Microbiol.** **29**: 1129-1136.
- Hild, E.; Takayama, K.; Olsson, R.; Kjelleberg, S. (2000) Evidence for a role of *rpoE* in stressed and unstressed cells of marine *Vibrio angustum* strain S14. **J. Bacteriol.** **182**(24): 6964-6974.
- Hirano, T.; Kinoshita, N.; Morikawa, K.; Yanagida, M. (1990) Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein *nuc2+*. **Cell** **60**: 319-328.
- Hoadley, A. W.; Cheng, C. M. (1974) Recovery of indicator bacteria on selective media. **J. Appl. Bacteriol** **37**: 45-57.
- Hobbie, J. (1966) **Proc. I.B.P. Symp. Amsterdam and Nieuwersluis, Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, p. 245.
- Inoue, K.; Matsuzaki, H.; Matsumoto, K.; Shibuya, I. (1997) Unbalanced membrane phospholipid compositions affect transcriptional expression of certain regulatory genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **179**: 2872-2878.
- Jenkins, D. E.; Schultz, J. E.; Matin, A. (1988) Starvation-induced cross protection against heat or  $H_2O_2$  challenge in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **170**: 3910-3914.
- Johnson, J. R.; Russo, T. A. (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **J. Lab. Clin. Med.** **139**(3): 155-162.
- Jordan, K. N.; Oxford, L.; O'Byrne, C. P. (1999) Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. **Appl. Environ. Microbiol.** **67**(7): 3048-3055.
- Keene, W. E.; McAnulty, J. M.; Hoesly, F. C. (1994) A swimming associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **N. Engl. J. Med.** **331**: 579-584.

- Keene, W. E.; Sazie, E.; Kok, J. (1997) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. **JAMA** 277: 1229-1231.
- Keenleyside, W. J.; Jayaratne, P.; MacLachlan, R.; Whitfield, C. (1992) The *rcaA* gene of *Escherichia coli* O9:K30:H12 is involved in the expression of the serotype-specific group I K (capsular) antigen. **J. Bacteriol.** 174(1): 8-16.
- Kharat, A. S.; Mahadevan, S. (2000) Analysis of the  $\beta$ -glucoside utilization (*bgl*) genes of *Shigella sonnei*: evolutionary implications for their maintenance in a cryptic state. **Microbiology** 146: 2039-2049.
- Kolling, G. L.; Matthews, K. R. (2001) Examination of recovery in vitro and in vivo of nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(9): 3928-3933.
- Kuhnert, P.; Boerlin, P.; Frey, J. (2000) Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews** 24: 107-117.
- Kullik, I.; Giachino, P.; Fuchs, T. (1998) Deletion of the alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. **J. Bacteriol.** 180: 4814-4820.
- Lambert, R. J. W.; Hoynson, J.; Forbes, B. (2001) The relationship and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. **J. Appl. Microbiol.** 91: 972-984.
- Laplace, J.; Thuault, M.; Hartke, A.; Boutibonnes, P.; Auffray, Y. (1997) Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. **Curr. Microbiol.** 34: 284-289.
- Law, D. (2000) Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli*. **J. Appl. Microbiol.** 88: 729-745.
- LeChevallier, M. W.; Cheryl, D. L.; Lee, R. G. (1990) Disinfection biofilms in a model distribution system. **J. Am. Water Works Assoc.** 82: 87-99.
- LeCoq, D.; Lindner, C.; Krüger, S.; Steinmetz, M.; Stülke, J. (1995) New  $\beta$ -glucoside (*bgl*) genes in *Bacillus subtilis*: the *bglP* gene product has both transport and regulatory functions similar to those of BglF, its *Escherichia coli* homolog. **J. Bacteriol.** 177(6): 1527-1535.
- Leung, G. S.; Zhang, M.; Xie, W. J.; Kwan, H. S. (2000) Identification by RNA fingerprinting of genes differentially expressed during the development of basidiomycete *Lentinula edodes*. **Mol. Gen. Genet.** 262: 977-990.
- Liang, P.; Pardee, A. B. (1992) Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. **Science** 257(5072): 967-971.
- Lisle, J. T.; Broadaway, S. C.; Prescott, A. M.; Pyle, B. H.; Fricker, C.; McFeters, G. A. (1998) Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157: H7. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(12): 4658-4662.
- Lleó, M. M.; Bonato, M. C.; Tafi, C.; Signoretto, M.; Boaretti, M.; Canepari, P. (2001) Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. **J. Appl. Microbiol.** 91: 1095-1102.
- Lüthy, L.; Grutter, M. G.; Mittl, P. R. (2002) The crystal structure of *Helicobacter pylori* cysteine rich protein B reveals a novel fold for a penicillin binding protein. **J. Biol. Chem** (<http://www.jbc.org/cgi/reprint/M108993200v1.pdf>)

- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (1997) **Brock Biology of Microorganisms**. 8ª Edição Prentice-Hall Inc. New Jersey.
- Makino, K.; Yokoyama, K.; Kubota, Y.; Yutsudo, C. H. *et al.* (1999) Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. **Genes. Genet. Syst.** **74**(5): 227-239.
- Mahadevan, S. (1997) The BglG group of antiterminators: a growing family of bacterial regulators. **J. Biosci** **22**: 505-513.
- Mao, Y.; Doyle, M. P.; Chen, J. (2001) Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bacteriol.** **183**(12): 3811-3815.
- Mason, C. A.; Dünner, J.; Indra, P.; Colangelo, T. (1999) Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. **Appl. Environ. Microbiol.** **65**(8): 3433-3440.
- Matin, A.; Harakeh, S. (1990) Effect of starvation on bacterial resistance to disinfectants, pp. 88-103. In G. A. McFeters (ed) **Drinking water microbiology**. Springer-Verlag New York Inc., New York.
- McDonnell, G.; Russell, A. D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** **12**(1): 147-179.
- McFeters, G. A. (1990) Enumeration, Occurrence, and significance of injured indicator bacteria in Drinking Water. pp 478-492. In G. A. McFeters (ed) **Drinking water microbiology**. Springer-Verlag New York Inc., New York.
- McFeters, G. A.; Camper, A. K. (1983) Enumeration of indicator bacteria exposed to chlorine. **Adv. Appl. Microbiol.** **43**: 177-193.
- McFeters, G. A.; Stuart, D. G. (1972) Survival of coliform bacteria in natural waters: field and laboratory studies with membrane-filter chambers. **Appl. Microbiol.** **24**(5): 805-811.
- McClelland, M.; Sanderson, K. E.; Spieth, J.; Clifton, S. W.; Latreille, P.; Courtney, L. *et al.*, (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature** **413**(6858): 852-856.
- Mead, P., S.; Griffin, P. M. (1998) *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet** **352**: 1207-1212.
- Mermin, J.; Mead, P.; Gensheimer, K.; Griffin, P. (1996) Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections among boy scouts in Maine. Abstr. K 44. p. 258 **36<sup>th</sup> Intersc. Conf. Antimicrob. Agents. Chemother.** American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Morgan, D.; Newman, C. P.; Hutchinson, D. N.; Walker, A. M.; Rowe, B.; Majid, F. (1993) Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. **Epidemiol. Infect.** **111**: 181-187.
- Morita, R. Y. (1982) Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment. **Adv. Microbial Ecology** **6**: 171-197.
- Moro, M. H.; Beran, G. W.; Griffith, R. W.; Hoffman, L. J. (2000) Effects of heat stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine. **J. Appl. Microbiol.** **88**: 836-844.
- Mou, L.; Miller, H.; Li, J.; Wang, E.; Chalifour, L. (1994) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **199**: 564-569.
- Mudge, C. S.; Smith, F. R. (1935) Relation of action on chlorine to bacterial death. **American Journal of Public Health** **25**: 442-447.

- Nagel, A. C.; Fleming, J. T.; Saylor, G. S.; Beattie, K. L. (2001) Screening for ribosomal-based false positives following prokaryotic mRNA differential display. **Biotechniques** 30(5): 988-990.
- Nataro, J. P.; Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11(1): 142-201.
- National Institute of Health and Infectious Disease. (1997) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (enterohemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996-June 1997. **Infectious Agents Surveillance Report** 18: 153-154.
- Notley-Robb, L.; King, T.; Ferenci T. (2002) *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. **J Bacteriol** 184(3):806-811.
- Nyström, T. (2001) Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. **Arch. Microbiol.** 176: 159-164.
- Ogawa, H.; Fukushima, K.; Sasaki, I.; Matsuno S. (2000) Identification of genes involved in mucosal defense and inflammation associated with normal bacteria. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.** 279(3): G491-499.
- O'Neal, C. R.; Gabriel, W. M.; Turk, A. K.; Libby, S. J.; Fang, F. C.; Spector, M. P. (1994) RpoS is necessary for both the positive and negative regulation of starvation survival genes during phosphate, carbon and nitrogen starvation in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 176: 4610-4616.
- Okuda, Y.; Denda, K.; Fukumori, Y. (1996) Cloning and sequencing of a gene encoding a new member of the tetratricopeptide protein family from magnetosomes of *Magnetospirillum magnetotacticum*. **Gene** 171: 99-102.
- Oliver, B. G.; Carey, J. H. (1976) Ultraviolet disinfection, an alternative to chlorination. **J. Water. Pollut. Control Fed.** 48: 2619-2627.
- Parker, L. L.; Hall, B. G. (1990) Characterization and nucleotide sequence of the cryptic *cel* operon of *Escherichia coli* K12. **Genetics** 124: 455-471.
- Paulino, L. C.; de Mello, M. P.; Ottoboni, L. M. (2002) Differential gene expression in response to copper in *Acithiobacillus ferrooxidans* analysed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Electrophoresis.** 23(4): 520-527.
- Perna, N. T.; Plunkett, G. III; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, J. D. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature** 409(6819): 529-533.
- Pichereau, V.; Hartke, A.; Auffray, Y. (2000) Starvation and osmotic stress induced multiresistances: influences of extracellular compounds. **Int. J. Food Microbiol.** 55: 19-25.
- Pierard, D. (1992) Infections with verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Acta Clin Belg** 47: 387-396.
- Pomposiello, P. J.; Bennik, M. H. J.; Demple, B. (2001) Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. **J. Bacteriol.** 183(13): 3890-3902.
- Potter, L.; Millington, P.; Griffiths, L.; Cole, J. (2000) Survival of bacteria during oxygen limitation. **Int. J. Food Microbiol.** 55: 11-18.
- Quinn, Ch. L.; Stephenson, B. T.; Switzer, R. L. (1991) Functional organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon. **J. Biol. Chem.** 266(14): 9113-9127.

- Ramalho, R.; Cunha, J.; Teixeira, P.; Gibbs, P.A. (2001) Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. **J Microbiol Methods** 44(2):97-103
- Ray, P. E.; Liu, X. H. (2001) Pathogenesis of Shiga toxina-induced hemolytic uremic syndrome. **Pediatr. Nephrol.** 16(10): 823-839.
- Rhoades, E. R.; Short, S. G. (1970) Susceptibility of *Serratia*, *Pseudomonas*, and *Enterobacter* to acetic acid. **Antimicrobiol. Agent. Chemoth.** 498-502.
- Rockabrand, D.; Austin, T.; Kaiser, R.; Blum, P. (1999) Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling: does chlorination kill coliforms in municipal effluent? **Appl. Environ. Microbiol.** 65(9): 4181-4188.
- Rogers, J.; Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Lee, J. V.; Keevil, C. W. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 1585-1592.
- Rowe, M. T.; Kirk, R. B. (2000) Effect of nutrient starvation on the resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to subsequent heat stress. **J. Food Prot.** 63(12):1745-1748.
- Saby, S.; Leroy, P.; Block, J. (1999) *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(12): 5600-5603.
- Saier Jr., M. H.; Paulsen, I. T. (2001) Phylogeny of multidrug transporters. **Cell & Develop. Biol.** 12: 205-213.
- Samarakandi, M. M.; Roques, C.; Michel, G. (1997) Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloroamine. **Can. J. Microbiol.** 43: 751-758.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. E. (1989) **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sears, C. L.; Kaper, J. B. (1996) Enteric bacterial toxins: mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.** 60: 167-215.
- Solo-Gabriele, H. M.; Wolfert, M. A.; Desmarais, T. R.; Palmer, C. J. (2000) Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(1): 230-237.
- Stewart, P. S.; Hamilton, M. A.; Goldstein, B. R. (1996) Modeling biocide action against biofilms. **Biotechnol. Bioeng.** 49: 445-455.
- Stout, V.; Torres-Cabassa, A.; Maurizi, M. R.; Gutnick, D.; Gottesman, S. (1991) RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. **J. Bacteriol.** 173: 1738-1747.
- Szakál, D.; Gadó, I.; Pál, T. (2001) A colony blot immunoassay to detect enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* in water samples. **J. Appl. Microbiol.** 90: 229-236.
- Thomas, J. G.; Baneyx, F. (1998) Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG in vivo. **J. Bacteriol.** 180: 5165-5172.
- Toze, S. (1999) PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water. Res.** 33(17):3545-3556.
- Tryland, I.; Pommeypuy, M.; Fiksdal, L. (1998) Effect of chlorination on  $\beta$ -D-galactosidase activity of sewage bacteria and *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.** 85: 51-60.

- U. S. EPA (1992) **Guidelines for water reuse**. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- U. S. FDA (1998) **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. U. S. Food & Drug Administration (<http://vm.cfsan.fda.gov/list.html>)
- Venkobachar, C.; Iyengar, L.; Rao, A. V. S. P. (1977) Mechanisms of disinfection: effect of chlorine on cell membrane functions. **Water Res.** **63**: 771-774.
- Vollertsen, J.; Jahn, A.; Nielsen, J. L.; Hvitved-Jacobsen, T.; Nielsen, P. H. (2001) Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater. **Wat. Res.** **35**(7): 1649-1658.
- Volk, C. J.; LeChevallier, M. W. (1999) Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distributions systems. **Appli. Environ. Microbiol.** **65**(11): 4957-4966.
- Wall, P. G.; McDonnell, R. J.; Adak, G. K.; Cheasty, T.; Smith, H. R.; Rowe, B. (1996) General outbreaks of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. **Commun. Dis. Rep. CDR Rev.** **6**: R26-R33.
- Weagant, S. D.; Bryant, J. L.; Bark, D. H. (1994) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. **J. Food Prot.** **57**: 629-631.
- Welsh, J.; Chada, K.; Dalal, S. S.; Cheng, R.; Ralph, D.; McClelland, M. (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Res.** **20**: 4965-4970.
- Wiedmann, M.; Arvik, T. J.; Hurley, R. J.; Boor, K. J. (1998) General stress transcription factor  $\sigma^B$  and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. **J. Bacteriol.** **180**: 3650-3656.
- Winderickx, J. & Castro, J. M. (1994) **Practical course in molecular biology of microorganisms**. Universidade Federal de Ouro Preto – MG, January 23 – February 11, pp. 59.
- Wolfe, R. L.; Ward, N. R.; Olson, B. H. (1984) Inorganic chloramines as drinking water disinfectants: a review. **J. Am Water Works Assoc.** **76**: 74-88.
- Wong, K. K.; McClelland, M. (1994) Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** **91**: 639-643.
- World Health Organization a.(2002) **Water supply sanitation and hygiene links to health**. [www.who.int/phe](http://www.who.int/phe)
- World Health Organization b (2002) **Guidelines for drinking water quality**. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/GDWQ/Microbiology/GDWQMicrobiological2.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Microbiology/GDWQMicrobiological2.html)
- Xu, X.; Stewart, P. S.; Chen, X. (1996) Transport limitation of chlorine disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* entrapped in alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** **49**: 93-100.
- Xu, N.; Johns, B.; Pullman, G.; Cairney, J. (1997) Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue: mass cloning and characterization of differentially expressed genes from loblolly pine embryos. **Plant Mol. Biol. Reporter** **15**: 377-391
- Xu, Y.; Singh, K. V.; Qin, X.; Murray, B. E.; Weinstock, G. M. (2000) Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. **Infect. Immun.** **68**(2): 815-823.
- Yildiz, F. H.; Schoolnik, G. K. (1999) *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. **PNAS** **96**: 4028-4033.