



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Análise de colinearidade gênica do operon *aprX-lipA* em isolados de
*Pseudomonas fluorescens***

ISRAEL SANTOS DA SILVA

CAMARAGIBE
2023

ISRAEL SANTOS DA SILVA

Análise de colinearidade gênica do operon *aprX-lipA* em isolados de *Pseudomonas fluorescens*

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientador: Nara Suzy Aguiar de Freitas.
Coorientador: Paulo Eleutério Roberto de Souza.

RECIFE
2023

ISRAEL SANTOS DA SILVA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a Silva, Israel
Análise de colinearidade gênica do operon aprX-lipA em isolados de *Pseudomonas fluorescens* / Israel Silva. - 2023.
36 f. : il.
- Orientador: Nara Suzy Aguiar de Freitas.
Coorientador: Paulo Eleuterio Roberto de Souza.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2023.
1. Psicotrófico. 2. Evolução. 3. Genoma. 4. Contexto genômico. I. Freitas, Nara Suzy Aguiar de, orient. II. Souza, Paulo Eleuterio Roberto de, coorient. III. Título

Análise de colinearidade gênica do operon *aprX-lipA* em isolados de *Pseudomonas fluorescens*

Comissão avaliadora:

Nara Suzy Aguiar de Freitas

Prof^a - UFRPE

Orientadora

Dayane da Silva Santos

M.Sc - UFPE

Membro titular

Anna Carolina Soares Almeida

Profa^a Ph.D - UFRPE

Membro titular

Fernanda Cristina Bezerra Leite

Prof^a Dr^a - UFRPE

Suplente

Recife 2023

Agradecimentos

Neste período de encerramento da graduação, gostaria de expressar a imensa gratidão que tenho a todas as pessoas e instituições que tornaram não só a realização deste trabalho, como me auxiliaram nessa jornada de crescimento pessoal e profissional.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza e minha co-orientadora Nara Suzy Aguiar de Freitas pelo apoio, dedicação e compreensão em muitos momentos neste percurso, sem os seus insights e encorajamentos o caminho teria sido mais difícil do que geralmente é. Suas orientações moldaram este trabalho e este novo profissional que me torno.

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo ambiente enriquecedor, infraestrutura e pela oportunidade ímpar de aprendizado que tive nesse espaço.

A jornada acadêmica nada seria sem os amigos que fazemos ao longo desses cinco anos, os momentos de descontração, de auxílio em momentos mais difíceis e os laços que formamos são extremamente importantes para mim e com certeza quero levá-los para a vida.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, que me permitiram desenvolver ainda mais minhas habilidades em equipe e de trabalho em grupo, sempre servindo de alicerce para mim, assim como pude servir para eles, sempre lembrarei de cada um de vocês.

Por fim gostaria de dedicar este trabalho à minha família a quem devo todo amor, apoio e paciência nessa fase incrível que foi a da graduação.

Resumo

Pseudomonas fluorescens são bacilos gram-negativos que possuem motilidade e estão presentes em ecossistemas terrestres e aquáticos. Por possuírem característica psicrotrófica, essas bactérias estão frequentemente relacionadas à contaminação de leite não pasteurizado e seus derivados, como queijo e manteiga. As proteases e lipases produzidas por *P. fluorescens* são o principal fator na prevalência de contaminação de produtos lácteos. Essas enzimas são codificadas pelos genes *aprX* e *lipA*, presentes no operon *aprX-lipA*. Nesse sentido, avaliamos os componentes genômicos circunvizinhos ao operon *aprX-lipA* de *P. fluorescens* de diferentes origens, visando detectar padrões genéticos inerentes a esses organismos e sua correlação com a atividade proteolítica. Utilizamos o banco de dados do NCBI, a plataforma *String* e *Interpro* para avaliação comparativa dos genomas selecionados. Nos quatro isolados analisados o operon *aprX-lipA* é altamente variado, estruturalmente, com configurações exclusivas para cada genoma. As relações de co-expressão gênica dos genes circunvizinhos à protease *aprX*, também, apresentam variações qualitativas e quantitativas, intra e inter-espécies do gênero *Pseudomonas*. Detectamos os componentes do sistema CRISPR tipo 1, até então não relacionado com o operon, que podem amplificar, movimentar e modificar genes relacionados com o mecanismo de defesa, patogênico ou não, do gênero. Os padrões relacionados à patogenicidade, indicam que novos biomarcadores podem ser utilizados pela vigilância genômica.

Palavras-chave: Psicrotrófico, genoma, evolução, contexto genômico.

Abstract

Pseudomonas fluorescens are Gram-negative bacilli that are motile and found in terrestrial and aquatic ecosystems. Due to their psychrotrophic characteristics, these bacteria are often associated with the contamination of unpasteurized milk and its derivatives, such as cheese and butter. The proteases and lipases produced by *P. fluorescens* are the primary factors in the prevalence of dairy product contamination. These enzymes are encoded by the *aprX* and *lipA* genes, which are present in the *aprX-lipA* operon. In this regard, we evaluated the genomic components surrounding the *aprX-lipA* operon of *P. fluorescens* from different sources, aiming to detect genetic patterns inherent to these organisms and their correlation with proteolytic activity. We used the NCBI database, the *String* platform, and Interpro for comparative evaluation of the selected genomes. In the four isolates analyzed, the *aprX-lipA* operon is highly variable structurally, with unique configurations for each genome. The gene co-expression relationships of the genes surrounding the *aprX* protease also show qualitative and quantitative variations, both intra- and inter-species within the *Pseudomonas* genus. We detected components of the CRISPR type 1 system, previously unrelated to the operon, which can amplify, move, and modify genes related to the defense mechanism, pathogenic or not, of the genus. The patterns related to pathogenicity indicate that new biomarkers can be used for genomic surveillance.

Keywords: psychrotrophic, genome, evolution, genomic context

Lista de figuras

Figura 1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain Pf0-1	6
Figura 2. Organização estrutural do operon <i>aprX-lipA</i> presente em <i>Pseudomonas fluorescens</i>	9
Figura 3. Organização estrutural do operon <i>aprX-lipA</i> mais abundantes em <i>Pseudomonas</i> sp. descritas por Maier et al (2020).	10
Figura 4. Árvore filogenética do grupo <i>Pseudomonas</i>	11
Figura 5. Disposição da organização do operon <i>aprX-lipA</i> nos quatro isolados de <i>Pseudomonas fluorescens</i> selecionados	16
Figura 6. Genes e produtos proteicos à esquerda e direita do operon <i>aprX-lipA</i> dos isolados de <i>P. fluorescens</i> , tendo como referência o isolado SRM1.	18
Figura 7. Espécies de <i>Pseudomonas</i> que apresentaram maiores similaridades quanto a co-vizinhança gênica do operon <i>aprX-lipA</i> : as linhas transversais no gene <i>aprX</i> indicam que sua ortologia é complexa; <i>hlyD*</i> não são o componente <i>HlyD</i> mas se relacionam com ele; A posição das setas indicam o sentido 5' - 3' ou 3' - 5'	20
Figura 8. Índice de co-ocorrência dos genes de <i>aprX-lipA</i> no genoma de outras espécies de <i>Pseudomonas</i> , obtidos da plataforma String . Os padrões de similaridade entre os genes do operon são denotadas a partir de gradientes de cores que variam do branco, rosa, vermelho e preto. Quanto mais denso o gradiente de cores, mais similar e conservado é o gene nas outras espécies do gênero analisado.	22
Figura 9. Avaliação de co-expressão entre os genes do operon <i>aprX-lipA</i> em grupos de <i>Pseudomonas</i> obtido através da plataforma String. Os padrões de co-expressão entre os genes são definidos pelo gradiente de cor dos quadrados inseridos na matriz triangular, quanto mais escuro for, maior a sua correlação em expressão e funcionalidade.	23
Figura 10. Taxa de coexpressão entre <i>HlyD</i> e <i>aprE</i> observados em grupos externos à <i>P. fluorescens</i> obtido através da ferramenta Coexpression da plataforma String.	23

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequência de isolados disponíveis no NCBI determinando a presença (+) ausência (-) entre os genes do operon aprX -lipA.	15
---	----

Lista de abreviaturas e símbolos

HTH: Helix-turn-helix

DUF: domains of unknown function

AntP: anti transportador de potássio

AutT: autotransportador

ORF: região de leitura aberta

FadOx: Fad oxiredutase

ApoTrans: apolipoprotein N-acyltransferase

PGM: Fosfoglucomutase

VN: Domínio VRR NUC

CRISPR: Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 O gênero <i>Pseudomonas</i>	3
2.2 Bactérias psicrotróficas	4
2.3 Espécie <i>Pseudomonas fluorescens</i>	6
2.4 Proteases: Aspectos e funções	7
2.5 O gene <i>aprX</i> e operon <i>aprX-lipA</i>	9
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Obtenção das sequências dos genes do operon <i>aprX-lipA</i>	13
4.2 Análise do contexto genômico do operon entre os isolados estudados	13
5. RESULTADOS	14
5.1 Estrutura do operon <i>aprX-lipA</i> nos diferentes isolados de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	14
5.2 Colinearidade dos blocos gênicos ao operon <i>aprX-lipA</i> de isolados <i>Pseudomonas fluorescens</i> disponível no contexto genômico do NCBI	16
5.3 Contexto genômico do operon avaliado no String.	19
5.3.1 Gene Neighborhood	19
5.3.2. Co-ocorrência gênica do operon <i>aprX-lipA</i> entre diferentes espécies de <i>Pseudomonas</i>	20
5.3.3. Análise de co-expressão dos genes do operon <i>aprX-lipA</i> de diferentes espécies de <i>Pseudomonas</i>	22
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite no ano de 2019 foi de cerca de 34,84 bilhões de litros, por onde a indústria leiteira se distribui no país. Neste ano houve um aumento de 2,7% de produção em relação ao ano anterior e em 2020, período marcado pelo início da pandemia de COVID-19, a produção de leite voltou a crescer 2,8% com um volume de 734,08 milhões de litros superior ao ano anterior (EMBRAPA, 2021).

Atualmente, um dos maiores problemas enfrentados pela indústria de laticínios é a contaminação do leite por bactérias psicotróficas, microrganismos que conseguem efetuar sua atividade metabólica em temperaturas muito abaixo da temperatura ótima enzimática (27C^o). Além disso, esses organismos tendem a produzir enzimas termoestáveis que resistem ao armazenamento a frio (Machado *et al.*, 2017).

Um grande avanço observado na conservação do leite após a ordenha foi o processo de pasteurização, esse processo permitiu a diminuição na carga bacteriana encontrada na microbiota do leite, pois ele consiste no aumento da temperatura do alimento durante um certo período de tempo e posteriormente ele é resfriado, desta forma as populações de bactérias sensíveis a temperaturas extremas são geralmente destruídas. No entanto, apesar de ser um processo eficaz, a qualidade do leite está diretamente relacionado com as populações bacterianas presentes no meio, onde o processo de pasteurização consegue destruir as bactérias do meio mas não suas enzimas, que continuam ativas e degradando os alimentos (Stuknyté *et al.*, 2016).

A indústria de laticínios é uma das que mais sofrem com este problema, tendo em vista que o processo de refrigeração do leite não pasteurizado e de seus derivados é essencial para uma melhor conservação do alimento. Apesar do leite passar por processos de pasteurização e tratamento UHT (ultra-high-temperature), as enzimas produzidas por essas bactérias continuam ativas e resistem aos tratamentos de alteração extrema de temperatura, onde tais processos tem por finalidade eliminar as chances de uma possível contaminação do leite por bactérias mesófilas e termófilas, no entanto as psicotróficas não são eliminadas nesse processo (Machado *et al.*, 2017).

As *Pseudomonas* são um grupo de bactérias Gram-negativas, exclusivamente aeróbias que possuem atividade psicrotrófica, sendo elas responsáveis por cerca de 70-90% a microbiota do leite não pasteurizado (Quigley *et al.*, 2013). *Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria do gênero *Pseudomonas* spp. que tem a capacidade de produzir pigmentos fluorescentes de cor verde-amarelada. Essa bactéria é relevante na indústria de laticínios, pois pode causar a deterioração do leite não pasteurizado através da produção de proteases e lipases que degradam as proteínas do leite. Mesmo após a pasteurização a atividade proteolítica pode causar alterações no sabor e aroma do produto (Anderson *et al.*, 1982). Isso resulta em grandes perdas para a indústria e afeta diretamente a segurança alimentar dos consumidores. Diversos estudos apontam *P. fluorescens* como a bactéria psicrotrófica que mais prevalece na contaminação do leite e seus derivados (Longhi *et al.*, 2020; Lalucat *et al.*, 2020; DU *et al.*, 2022)

A capacidade psicrotrófica de *P. fluorescens* está diretamente ligada a presença dos genes *aprX* e *lipA* que produzem uma metaloprotease alcalina da família das serralisinas e lipases, respectivamente. É importante ressaltar que essas enzimas são termorresistentes. O gene *aprX* encontra-se no operon *aprX-lipA*, que é constituído por um inibidor de atividade da protease *inh*, dois precursores extracelulares de protease *prtAB*, o sistema de secreção tipo I *aprDEF* e um codificante de lipase *lipA* (Araújo *et al.*, 2019; Aguilera *et al.*, 2022).

Longhi *et al* (2020) observaram que apesar de *P. fluorescens* e *P. putida* estarem mais associados a alta atividade de proteólise no leite, cepas desses dois gêneros que não possuíam o gene *aprX* apresentaram atividade proteolítica, sendo 72% de atividade para *P. putida* e 64% *P. fluorescens*, indicando que seu potencial proteolítico poderia estar relacionado com a produção de outras metaloproteases.

A compreensão do operon *aprX-lipA* tem sido uma área de interesse significativo na microbiologia, pois apresenta importância crucial na atividade proteolítica de *P. fluorescens*, gerando implicações negativas na indústria. Apesar disso, questões fundamentais para o entendimento dessa estrutura e de seu papel no genoma da espécie ainda necessitam de maiores investigações. Neste sentido, buscamos avaliar o operon *aprX-lipA* de isolados de *P. fluorescens* de diferentes origens ambientais e seus genes circunvizinhos em busca de novas informações sobre suas participações nos processos funcionais e evolutivos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas*, presente na família *Pseudomonadaceae* é composto por bactérias gram-negativas amplamente distribuídas, possuem um metabolismo altamente versátil e estão presentes nos mais variados ecossistemas como o solo, ambientes aquáticos e na rizosfera, além disso são microrganismos estritamente aeróbios (Silby *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2013; Jun *et al.*, 2016).

Sua função na natureza é bastante ampla, é decompositora de material orgânico; reciclando nutrientes dos ecossistemas; espécies como *P. syringae* atuam como fitopatógenos; e outras possuem relações simbióticas com plantas para obtenção de nutrientes e proteção, em troca, ela quebra proteínas liberando metabólitos importantes para suas hospedeiras. Algumas espécies como *P. aeruginosa* possuem importância clínica considerável, sendo essa espécie a representante mais patogênica de *Pseudomonas*, pois geralmente está relacionada com diversos tipos de infecções hospitalares além de ser reportada em casos com potencial de multirresistência. Esta característica é proveniente da produção de enzimas e presença de mutações que podem ocorrer simultaneamente ou de forma isolada. Em ambientes hospitalares, a infecção por essa bactéria e outros microrganismos multirresistentes pode levar desde quadros mais simples até casos mais graves como sepse fulminante (Pchère *et al.*, 1999; Tortas *et al.*, 2009).

As *Pseudomonas* formam o grupo de bactérias com maior número de espécies conhecidas, com mais de 220 espécies caracterizadas. São amplamente utilizadas em técnicas taxonômicas em fase de testes iniciais, que permitiram o desenvolvimento de diversas ferramentas taxonômicas (Palleroni *et al.*, 2005).

Entre as diversas análises filogenéticas, o gênero *Pseudomonas* permitiu o desenvolvimento de técnicas para avaliação filogenética de grupos, utilizando sequências de rRNA 16S e análise de sequência de multilocus (MLSA) entre outras (Garrido *et al.*, 2016). Enquanto, sequências de genomas completos podem ter um poder ainda mais discriminatório, permitindo a separação de biótipos específicos (Lalucat *et al.*, 2020).

O gênero *Pseudomonas* é um dos mais abundantes em amostras de leite não pasteurizado, juntamente com os gêneros *Mycobacterium*, *Acinetobacter* e *Lactococcus*, que também são encontrados nesses ambientes. No entanto, a *Pseudomonas* spp. destaca-se por sua alta atividade proteolítica em relação aos demais (Baur *et al.*, 2015; Von Neubeck *et al.*, 2015). O gênero compreende três grandes grupos principais: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas pertucinogena* que foram subdivididos em 14 grupos (Lalucat *et al.*, 2020).

2.2 Bactérias psicrótróficas

Bactérias podem habitar os mais diversos ambientes encontrados em nosso planeta, sejam eles naturais ou não. Para sobreviver aos mais variados ambientes, as bactérias possuem diversos tipos de adaptações ao meio, com diversos genes selecionados para sobreviver em níveis de temperatura e pH diferentes (Iseppi *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2022). Os organismos denominados extremófilos possuem a capacidade de se adaptarem a estas variações, podendo colonizar habitats ecologicamente instáveis. Microrganismos psicrótróficos são aqueles que se estabelecem em ambientes de baixas temperaturas. A ação de tais pressões seletivas nesses isolados permitiu o surgimento de produtos metabólicos de grande importância para a indústria, como proteases, lipases e amilases que podem ser utilizados em diversas aplicações industriais como, alimentos, detergentes, indústria farmacêutica entre outras. (Li Q *et al.*, 2013; Pant G *et al.*, 2015).

Devido ao seu grande valor nutricional, o leite não pasteurizado se mostrou um ambiente altamente propenso à contaminação por bactérias psicrótróficas. Quigley *et al.* (2013) identificaram mais de 160 espécies de bactérias em galões de leite não refrigerados. A refrigeração do leite, é um procedimento utilizado mundialmente para evitar a contaminação do leite por organismos termófilos e mesófilos, que crescem em altas e médias temperaturas, respectivamente, no entanto, o ambiente refrigerado propicia o desenvolvimento de bactérias psicrótróficas (Quigley *et al.*, 2013; Neubeck *et al.*, 2015).

A contaminação do leite por bactérias psicrótróficas geralmente ocorre pela má higienização dos equipamentos utilizados no processo de ordenha e transporte do

leite, bem como também a má higiene dos tetos e do úbere dos animais. Em condições adequadas de higienização do local de ordenha, as bactérias psicrotróficas representam menos de 10% de toda microbiota do leite, no entanto, se todo o processo de higienização for feito de forma precária, as contagens de microrganismos psicrotróficos pode chegar à 76%, principalmente, quando não houver controle de qualidade da água (Guerreiro *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2015).

As bactérias psicrotróficas mais encontradas nos ambientes sob refrigeração são as gram-negativas *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter* e *Hafnia* e as gram-positivas possuem representantes como *Bacillus*, *Carnobacterium* e *Microbacterium* (Ribeiro *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2017).

A medição dos níveis de bactérias psicrotróficas nos alimentos refrigerados é de extrema importância pois estes microrganismos servem de indicadores da qualidade de armazenamento dos alimentos, níveis superiores à $1,3 \times 10^5$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia) são considerados altos o suficiente para que os danos no leite não pasteurizado armazenado em ambientes refrigerados sejam observados. Os níveis de contaminação bacteriana variam entre 10^2 a 10^7 UFC/mL dependendo da região observada e da época do ano em que as amostras para análise são coletadas (Marchand *et al.* 2009; Kim *et al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2018).

Além da produção de proteases lipases, outro fator que favorece o desenvolvimento desses organismos em ambientes extremos como os refrigerados é a produção de biofilmes, essas estruturas são abertas e altamente hidratadas, as microcolônias existentes dentro dessas estruturas são espaçadas e possuem altas concentrações de exopolímeros. Sua função primária é proteger as colônias bacterianas de adversidades ambientais, quando se ligam de forma irreversível a um substrato considerado favorável a sobrevivência desses organismos ou quando ligam-se entre si eles podem formar essa estrutura que os protege contra dessecação, radiação, alterações severas ambientais e compostos antimicrobianos. Além disso, elas permitem a troca facilitada de material genético, atividades relacionadas ao *quorum sensing* e reações enzimáticas (Sutherland *et al.*, 2001; Carey *et al.*, 2015).

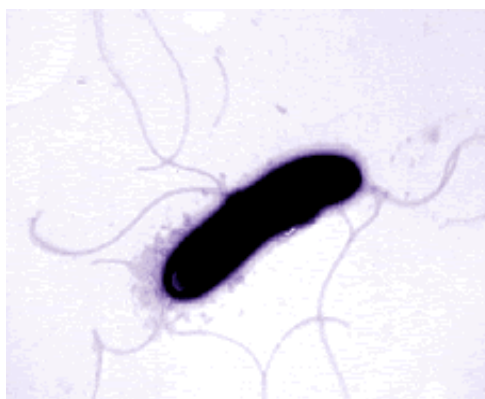
Segundo Longhi *et al.*, (2020) as bactérias psicrotróficas mais importantes na contaminação do leite são as da espécie *P. fluorescens*, enquanto as espécies mais importantes na contaminação de carnes são as *P. fragi* e *P. lundensis*.

2.3 Espécie *Pseudomonas fluorescens*

O complexo *P. fluorescens* é composto por 8 grupos que ocupam diversos nichos ecológicos conhecidos, são membros reconhecidos *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. koreensis*, *P. jessenii*, *P. corrugata* e *P. chlororaphis* (Lalucat *et al.*, 2020).

Pseudomonas fluorescens é uma bactéria aeróbia, ou seja, que necessita de oxigênio para crescer. Como todos os microrganismos do gênero *Pseudomonas*, elas se caracterizam morfológicamente por serem bastonetes (Figura 1) com eixo longo reto ou curvo e possuem motilidade por um ou dois flagelos no polo corporal, são bactérias gram-negativas e que não formam esporos, caules ou bainhas (Kumar *et al.*, 2019).

Figura 1. *Pseudomonas fluorescens* strain Pf0-1



Fonte: JGI, genome portal

Pseudomonas fluorescens é uma espécie que pode ser encontrada em diversos ambientes, como solos, fontes de água, poeira atmosférica e matéria orgânica em decomposição, no entanto ela possui uma grande variedade de hospedeiros animais, geralmente mamíferos e vegetais (Anzai *et al.*, 2000; Frapolli *et al.*, 2007).

Além de ambientes naturais, *P. fluorescens* já foi reportada em ambientes hospitalares relacionados à diversos casos clínicos. Liu *et al.* (2021) relataram um caso de pneumonia relacionado à infecção por essa espécie.

Ela é capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, iguais ou inferiores à 7C° (Lampugnani *et al.*, 2019) o que pode favorecer a sua proliferação em

locais de armazenamento de alimentos que, necessariamente, são resfriados para manutenção de sua qualidade como carnes, queijos, leite e etc. Uma das muitas razões para o potencial psicrotrófico da espécie é a capacidade desta bactéria produzir proteases e lipases que podem causar a degradação estrutural dos alimentos. As lipases atuam utilizando os lipídios presentes no leite não pasteurizado como fonte energética para síntese dos nutrientes necessários para a espécie, essa degradação lipolítica resulta na produção de aroma e sabor desagradáveis ao alimento, gerando diversos prejuízos (Beloti *et al.*, 2015).

As proteases por outro lado, atuam na desestabilização da estrutura de proteínas em peptídeos, que resulta num leite de má qualidade para o consumidor final, tendo em vista que a estabilização das proteínas é de extrema importância para garantir adequadas condições de processamento e aumentar o tempo de prateleira dos produtos derivados do leite (BRASIL *et al.*, 2015).

Pseudomonas fluorescens também é reportada em casos de infecção hospitalar, transportada através de água contaminada, fômites e insetos para unidades de terapia intensiva. Sua presença pode disseminar resistência a antimicrobianos. Embora não seja amplamente estudada em hospedeiros humanos, ela foi relatada em diversos casos clínicos, principalmente em complicações respiratórias (Zervos *et al.*, 1998; Dickson *et al.*, 2014; Heirali *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2021). Além disso, *P. fluorescens* é relevante na aquicultura, afetando peixes e pequenos invertebrados como camarões e siris, principalmente devido à sua protease alcalina AprX, que desempenha papel patogênico e de adesão às células hospedeiras (Zhang *et al.*, 2007)

2.4 Proteases: Aspectos e funções

As proteases, também conhecidas como peptidases, são enzimas catalisadoras de proteínas responsáveis pela hidrólise das ligações peptídicas. As enzimas que possuem alta especificidade tendem a degradar as proteínas em pequenos fragmentos, formando aminoácidos que são reciclados e utilizados em nova síntese proteica. Aquelas que possuem alvos específicos, atuam removendo partes da proteína ou introduzindo alterações estruturais, modificando sua funcionalidade biológica. Essas enzimas possuem diversas funções conhecidas,

controlando várias funções fisiológicas humanas como a morte celular programada, proliferação e diferenciação celular, resposta inflamatória, coagulação sanguínea, entre outros (Tomkinson *et al.*, 1999; Proost *et al.*, 2017; Rawlings *et al.*, 2018).

Essas enzimas possuem diversos papéis importantes na fisiologia e bioquímica bacteriana, estando envolvidas na biossíntese de parede celular, na proteção contra o estresse do ambiente, digestão de nutrientes, degradação de reguladores de sinalização e também estão envolvidas na patogenicidade desses microrganismos, permitindo que a bactéria penetre o hospedeiro gerando quadros clínicos (Moyaeri *et al.*, 2015; Akiyama *et al.*, 2015; Emiola *et al.*, 2015).

As enzimas proteolíticas são divididas em dois tipos: as endopeptidases, que clivam as ligações peptídicas internas do substrato proteico, e as exopeptidases, que realizam a clivagem da região terminal das proteínas. Elas podem remover aminoácidos do terminal N (aminopeptidases) ou do terminal C (carboxipeptidases). Cinco tipos principais de proteases são conhecidas, dependendo da natureza de seu sítio ativo. Elas podem ser classificadas em proteases aspárticas, que contêm resíduos de aspartato em seu sítio ativo, cisteína proteases, metaloproteases que utilizam íons metálicos em seu sítio ativo, serina proteases e treonina proteases. Cada tipo enzimático possui especificidades para os tipos de substratos em que desempenham suas atividades. Por exemplo, a tripsina, que é uma serina protease, geralmente reconhece ligações peptídicas onde o aminoácido na região C-terminal é uma lisina ou arginina (Hooper., 2002; Olsen *et al.*, 2004).

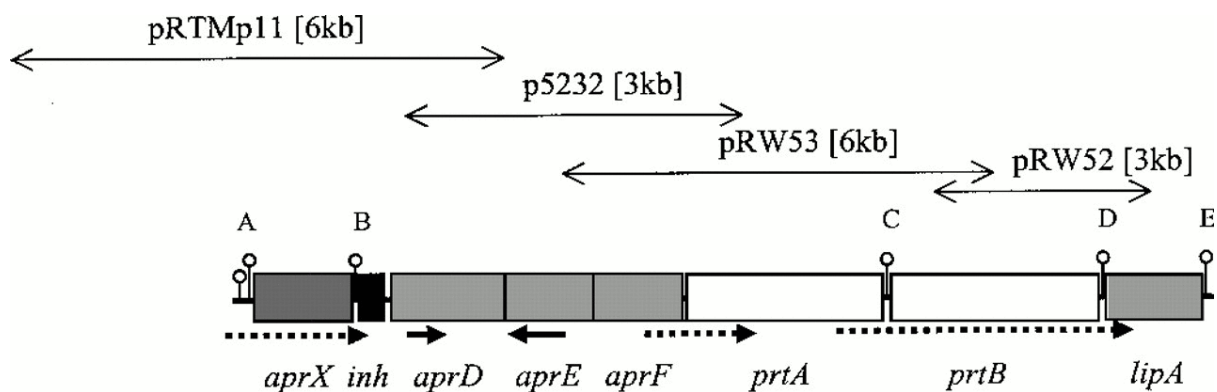
Os indivíduos com capacidade infectante utilizam essas enzimas para invadir o organismo de seus hospedeiros e conferir tolerância a estresses ambientais, permitindo sua permanência e replicação. As enzimas Lon, Clp, HtrA e FtsH são altamente conservadas e as mais relevantes na atividade patogênica, atuando no controle de proteínas mal formadas no ambiente adverso do hospedeiro e promovendo a quebra específica de proteínas que regulam resposta a alterações ambientais (Ingmer & Brondsted., 2009).

2.5 O gene *aprX* e operon *aprx-lipA*

O gene *aprX* está presente num óperon do genoma de *P. fluorescens* denominado *aprx-lipA*. Esse óperon (Figura 2) é composto por um sistema de secreção tipo I, que inclui os genes *aprD*, codificante de um cassete de ligação de ATP, *aprE* que é uma proteína de fusão de membrana e *aprF* que tem como produto uma proteína de membrana externa (Duong *et al.*, 2001). Além desse mecanismo, o óperon conta com um inibidor da protease alcalina *aprX*, que pode ser da família de inibidores *inh* ou *apri*, dependendo do organismo e, também, com duas proteínas de membrana externa *prtAB* e o gene *lipA* que produz lipases (Duong *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2001). Enquanto a regulação de expressão de *aprX* é feita pela alteração dos níveis de ferro no organismo.

O gene *aprX* codifica uma metaloprotease alcalina de zinco, que possui a função de degradar as proteínas presentes no ambiente a fim de gerar nutrientes importantes para as funções metabólicas da espécie. Estruturalmente, essa enzima possui dois sítios de ligação, Zn^{2+} e Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2009).

Figura 2. Organização estrutural do operon *aprx-lipA* presente em *Pseudomonas fluorescens*.



Fonte: Woods et al. 2001

A metaloprotease *aprX* é termoestável, ou seja, consegue realizar suas funções mesmo em temperaturas extremas, mantendo atividade residual da enzima inalterada mesmo após tratamento térmico (Ismail & Nielsen, 2010; Frohbieter *et al.*, 2005). Uma das possíveis razões para a alta resistência a temperatura presente na enzima *aprX* pode estar na sua estrutura proteica, que tem como característica ser altamente flexível, permitindo a realização de desdobramentos reversíveis durante o

processamento do leite. Sua flexibilidade ocorre por conta de uma grande quantidade de resíduos de glicina e baixos níveis de cisteína em sua organização, essa conformação ajuda a evitar as restrições dos ésteres das pontes dissulfeto. A AprX é uma proteína extracelular e a presença dos seus resíduos de glicina na região de ligação com o cálcio (Ca^{2+}), gera uma baixa frequência desse íon e induzindo uma maior flexibilidade proteica (Stoeckel *et al.*, 2016).

Além dos domínios relatados acima a proteína AprX apresenta resíduos de arginina, embora com menos frequência, esses domínios parecem conferir uma maior estabilidade térmica à enzima. Isso ocorre porque os resíduos de arginina conferem à proteína a capacidade de formar pontes salinas e ligações de H devido ao grupamento guanidina (Mateos *et al.*, 2015). Essas características de defesa das bactérias são altamente negativas para a conservação de alimentos (Rauh *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019).

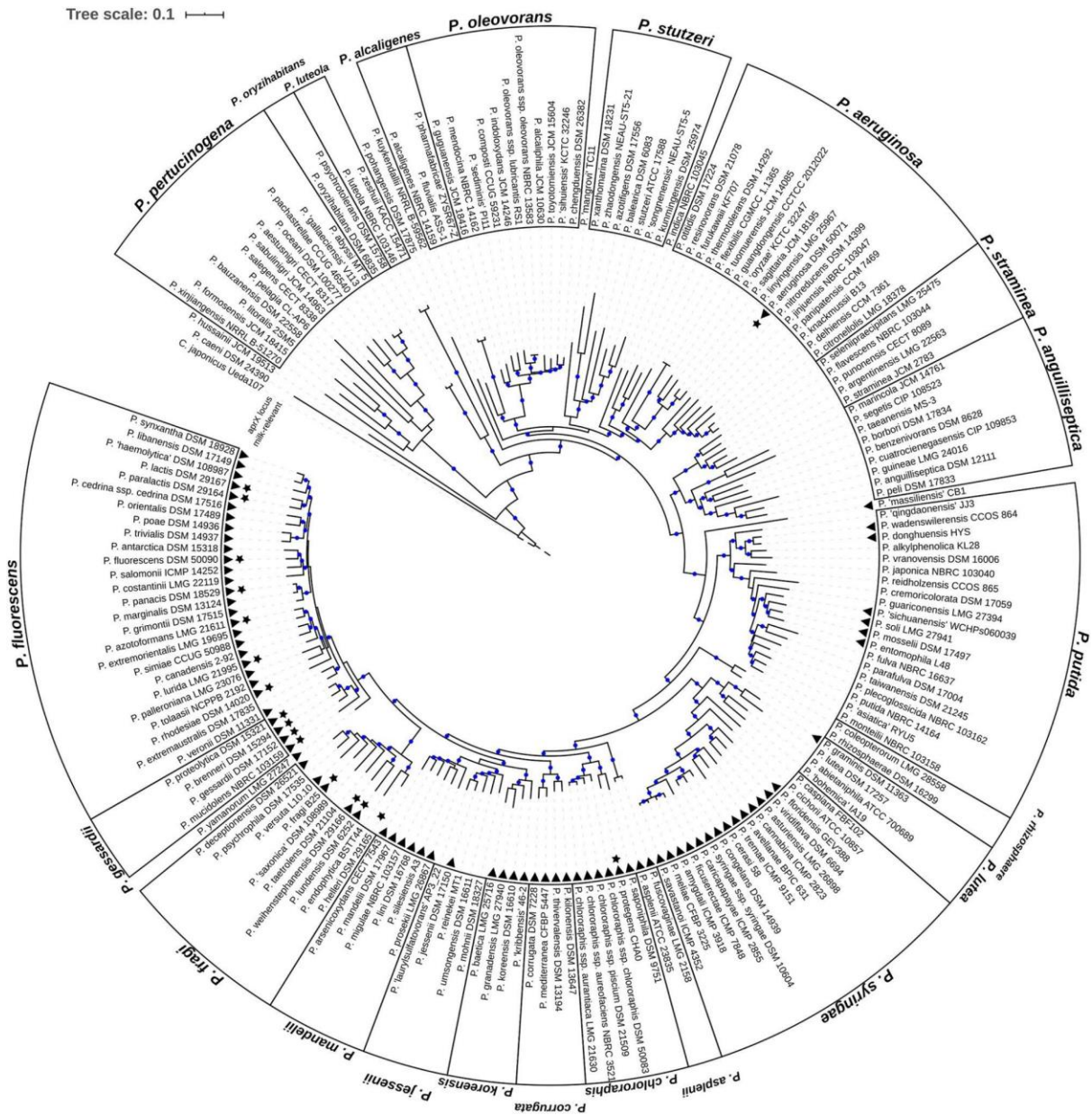
Maier *et al.* (2020), identificaram diferentes tipos de organização do óperon *aprX-lipA* (Figura 3) que apresentaram uma dinâmica gênica dessa região, diferenciando os isolados estudados. Em outra análise, Longhi *et al.* (2020), verificaram que a expressão do gene *aprX* não foi relacionada com o aumento ou diminuição de capacidade proteolítica, sendo as cepas utilizadas no estudo igualmente degradantes com ou sem a presença do gene, logo os autores atribuíram, que a capacidade proteolítica deve se relacionar com outros tipos de protease.

Figura 3. Organização estrutural do operon *aprX-lipA* mais abundantes em *Pseudomonas sp.* descritas por Maier *et al.* (2020).



Fonte: Maier *et al.* (2020)

Figura 4. Árvore filogenética do grupo *Pseudomonas*



Fonte: Maier et al. 2020

Aguilera et al. (2023) identificaram diferenças significativas na estrutura dos operons de *P. fluorescens*, além de avaliar a semelhança do gene *aprX* entre diferentes grupos de *Pseudomonas*. Este estudo indicou que, embora os grupos de *Pseudomonas* possam ser distintos em termos de seus operons, os domínios catalíticos da protease apresentaram variações intrínsecas em cada isolado estudado. Além do alinhamento do gene *aprX*, os genes relacionados ao mecanismo de secreção tipo I, *aprDEF*, foram usados para construir árvores filogenéticas do grupo *Pseudomonas* e exibiram os melhores grupos de alinhamento, sugerindo que

as diferenças estruturais nesse mecanismo pode desempenhar um papel importante na função proteolítica realizada pelas bactérias que possuem esse operon.

A literatura existente sobre o operon *aprX-lipA* tem apresentado resultados que provocam a necessidade de maiores informações. Portanto, buscamos conduzir novas abordagens de pesquisa genômica dedicadas a investigar essa região, a fim de obter novos *insights* sobre o contexto histórico da estrutura, funcionamento e evolução dos jogos de genes associados.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais:

Avaliar os genes circunvizinhos ao operon *aprX-lipA* de isolados de *Pseudomonas fluorescens*, de diferentes origens ambientais, a fim de estabelecer se o os mesmos interferem na capacidade proteolítica.

3.2 Específicos:

3.2.1 Selecionar sequências gênicas do operon *aprX-lipA* de *Pseudomonas fluorescens* de diferentes origens

3.2.2 Avaliar os padrões de similaridade do gene *aprX* e do operon *aprX-lipA* entre as sequências selecionadas

3.2.3 Analisar os genes circunvizinhos ao operon nos isolados selecionados, com ênfase nas anotações funcionais

3.2.4 Verificar as relações de co-expressão e co-ocorrência do operon nas demais espécies do gênero *Pseudomonas*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das sequências dos genes do operon *aprX-lipA*.

A obtenção das sequências dos genes do operon *aprX-lipA* envolveu, inicialmente, a localização no GenBank/NCBI dos genes do operon do isolado *Pseudomonas fluorescens* SRM1 ([CDMF01000001.1](#)), definida aqui, como espécie tipo. Posteriormente, a sequência foi utilizada como *query* (BLASTp) em busca de operons de outros isolados de *P. fluorescens*, para seleção foram utilizados os seguintes critérios:

- Possuírem genomas completos depositados nos bancos de dados.
- Serem provenientes de diferentes origens.
- Conter genes do operon organizados no genoma dos isolados.

Na sequência, foram identificados e investigados, as funções anotadas de dez genes circunvizinhos à direita e à esquerda do operon.

4.2 Análise do contexto genômico do operon entre os isolados estudados

As sequências FASTA das proteínas produzidas pelo operon foram depositadas no banco de dados *String* para análise completa do contexto genômico desse organismo. Nela foram analisadas as co-expressões, co-ocorrências e os genes vizinhos do operon *aprX-lipA* nos isolados utilizados no estudo, em comparação os outros grupos bacterianos do gênero *Pseudomonas*. Foram utilizadas as seguintes ferramentas para enriquecimento de dados:

- *Gene Neighborhood*: Utilizamos esta para identificar grupos gênicos comuns na vizinhança genômica de diferentes grupos bacterianos. Os genes são representados em colunas horizontais, e as matrizes de cor podem ser sólidas ou apresentar seções repartidas, refletindo a complexidade de suas histórias evolutivas.
- *Gene Co-Occurrence*: A análise de co-ocorrência gênica na plataforma *String* busca avaliar as similaridades nos padrões de ocorrência de genes. A semelhança entre genes é representada por cores que variam de branco a rosa e preto, sendo que gradientes de cor mais densos indicam maior conservação e similaridade dos genes em outros grupos bacterianos.

- *Gene Co-expression*: Realizamos análises de co-expressão gênica para identificar proteínas com genes correlacionados em termos de expressão e funcionalidade, tanto no conjunto selecionado quanto em grupos externos. Os quadrantes na matriz triangular foram utilizados para avaliar a proximidade de expressão e funcionalidade entre proteínas, com base na intensidade do gradiente cromático.

5. RESULTADOS

5.1 Estrutura do operon *aprX-lipA* nos diferentes isolados de *Pseudomonas fluorescens*.

Foram selecionadas quatro sequências genômicas de *P. fluorescens*, contendo elementos totais e parciais do operon *aprX-lipA*. Destas, a cepa *P. fluorescens* SRM1 foi usada referência para as análises comparativas, devido à maior disponibilidade de sequências gênicas de interesse, com oito unidades: *aprX-prtA-prtB-aprD-aprE-aprF-inh-lipA*.

A busca pelas sequências resultou em três isolados de diferentes origens e distintas organizações no operon *aprX-lipA*: *P. fluorescens* NCTC10783 isolado do trato respiratório humano; *P. fluorescens* DR397 de uma plantação de soja na China; e *P. fluorescens* MS82 proveniente do solo, na Coreia do Sul. Enquanto, a espécie tipo foi isolada na Austrália e a isolada do trato respiratório humano foi sequenciada no Reino Unido, mas não possui origem indicada (Figura 5 e Tabela 1).

O grupo externo foi representado pelo isolado *Bacillus subtilis* 168, nesse organismo o gene *aprX* aparece atrelado a uma outra hidrolase da família das metalo hidrolases, além de estar ligado a um complexo gênico relacionado com a síntese de bacillinae.

Tabela 1. Sequência de isolados disponíveis no NCBI determinando a presença (+) ausência (-) entre os genes do operon *aprX-lipA*.

Isolado*	<i>aprX</i>	<i>lipA</i>	<i>prtA</i>	<i>prtB</i>	<i>aprD</i>	<i>aprE</i>	<i>aprF</i>	<i>inh/aprI</i>	<i>lipB</i>	<i>aprA</i>	Origem
SRM1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Leite
NCTC10783	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	Trato respiratório humano
DR397	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	Soja
MS82	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	Solo
Bacillus subtilis 128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*

Os genes foram avaliados quanto a presença ou ausência no operon *aprX-lipA*. Após isso foram analisadas as sequências colineares de dez genes vizinhos à direita e à esquerda do operon, 5' - 3' e 3' - 5', respectivamente, ou seja, em sintonia aos operons dos quatro isolados utilizados no estudo (Tabela 1 e figura 5). Os componentes dos operons nos quatro isolados apresentam-se em jogos de diferentes organizações. Em *P. fluorescens* SRM1 e NCTC10783 eles aparecem em posição invertida aos dos isolados ambientais. Além disso, no isolado clínico alguns genes apresentam posições diferenciais, como o inibidor de protease, que está próximo ao gene *aprA* ao invés de *aprX* (Figura 5) e, os precursores extracelulares de protease *prtAB* e codificantes de lipase estão ausentes. Os isolados ambientais exibem os genes codificantes de protease, seu inibidor e o transportador *aprD* (Figura 5).

No isolado *P. fluorescens* NCTC10783, o operon *aprX-lipA* apresenta a seguinte estrutura gênica: *AprI-aprA-aprF-aprE-aprD-aprX*. O gene *aprA* é um parálogo de *aprX* que também codifica uma metaloprotease alcalina e se encontra no extremo oposto do operon nesse isolado, já o gene *aprI* é um inibidor de atividade enzimática da mesma família do inibidor presente em SRM1, *inh*. Nos isolados ambientais (soja e solo) a constituição dos genes no operon de *P. fluorescens* MS82 e *P. fluorescens* DR397 são : *AprX(A)-Inh-aprD AprX(A)-inh-aprD*, respectivamente (Figura 5).

Apenas no isolado tipo SRM1 e no clínico NCTC10783 o gene *lipA* é codificante de lipases. Todavia, no isolado clínico, esse gene está fora da área estudada. Os

genes *lipA* presentes nos isolados ambientais são codificantes de ácido lipóico (LA), um importante cofator de enzimas.

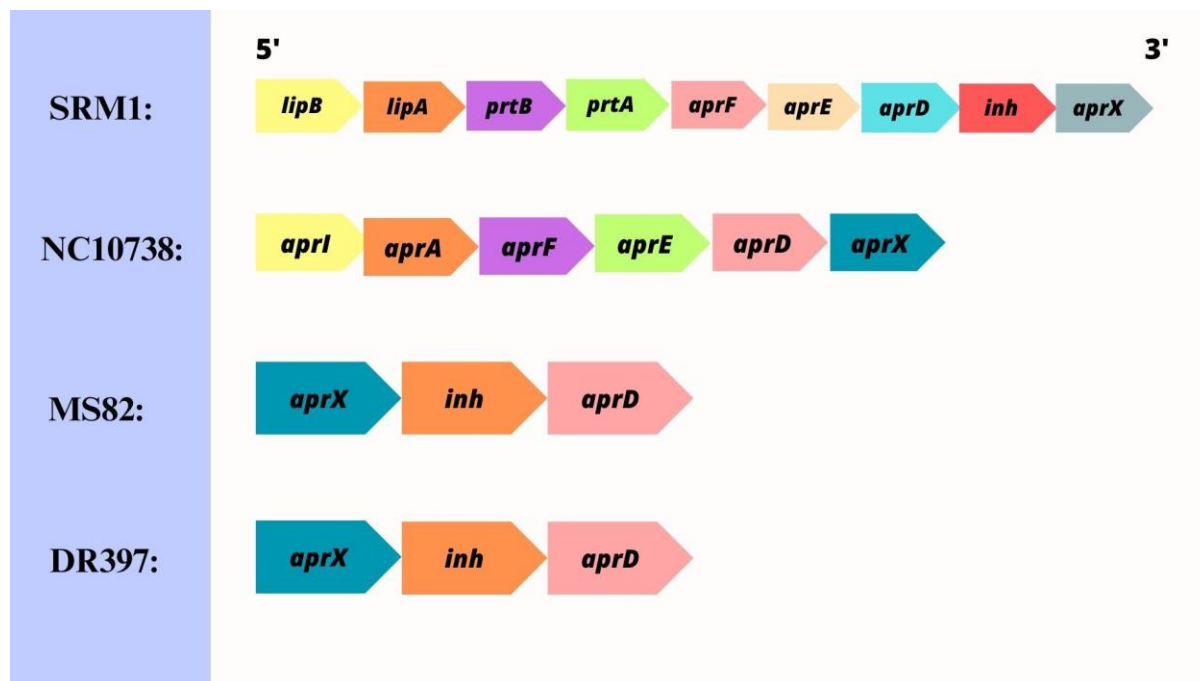


Figura 5. Disposição da organização do operon *aprX-lipA* nos quatro isolados de *Pseudomonas fluorescens* selecionados

5.2 Colinearidade dos blocos gênicos ao operon *aprX-lipA* de isolados *Pseudomonas fluorescens* disponível no contexto genômico do NCBI

Nos isolados de *P. fluorescens* DR397 e MS82, a região de cadeia gênica localizada à esquerda do operon *aprX-lipA*, possui componentes genéticos similares a região à direita do operon da espécie tipo (Figura 6).

Em *P. fluorescens* SRM1 encontram-se os genes *PotF*-*Cupin*-*Duf*-*MeIR*-*Duf*-*UvrD*-*Pirin*-*PGM*-*YdcR*-*hipo*. Enquanto nos dois isolados ambientais, a composição dos genes e produtos proteicos à direita do operon se dá da seguinte forma: *P. fluorescens* MS82: *PotF* - *Cupin* - *FadOx* - *HTH* - *DUF1652* - *UvrD* - *pirin* - *PGM* - *GntR* - *hipo*; *P. fluorescens* DR397: *Abc transporter*- *Cupin* - *FadOx*. - *HTH* - *DUF1652* - *UvrD* - *pirin* - *PGM* - *GntR* - *hipo*.

Os genes codificantes de proteínas *Cupin*, *FAD* oxirredutase (*FadOx*), proteína pirina e o gene *UvrD* estão compartilhados nesses três organismos em posição sequencial similar, mas invertidos no isolado lácteo SRM1. (Figura 6)

A identificação de determinados genes nos isolados analisados não pôde ser feita, uma vez que, em alguns casos, apenas o seu produto proteico pôde ser caracterizado. Em outros casos, as informações disponíveis nos repositórios genômicos não se mostraram suficientes para as atribuições precisas das proteínas que se encontram nas regiões estudadas. Dessa forma, optou-se por manter a designação de "proteína hipotética" para os genes não identificados, cujas funções, por ora, não foram definidas.

Para aquelas regiões que não identificamos o genes, mas sabemos os produtos proteicos, designamos os nomes das proteína, como as proteínas de domínio Cupin, proteínas da família Pirina Pirin) e Fosfoglucomutases (PGM) presentes nos isolados *P. fluorescens* MS82 e DR387 (Figuras 6). No isolado *P. fluorescens* NCTC10738 entre os componentes genéticos destaca-se o sistema CRISPR tipo 1, localizado à direita do operon *aprX*: *LasR/QslA* - *Cas1e* - *Cas6e* - *Cas5e* - *Cas7e* - *casB* - *casA* - *cas3* - *PAS*.

A figura 6 mostra semelhanças estruturais na porção à direita e esquerda do operon entre os isolados *P. fluorescens* MS82 e DR397. Observa-se que os sete primeiros genes e seus produtos à direita desse do operon são os seguintes: *aprD* - *HlyD* - *ToIC* - transportador - transportador - poliuretase - poliuretase. A variação ocorre apenas nos três últimos genes da sequência de vizinhos ao operon nesses isolados, onde em MS82 há uma proteína ainda não definida (hipotética), uma lipoproteína da família YgdI/YgdR e um domínio VRR-NUC (VN). E no isolado DR397 há uma proteína de domínios repetidos RHS, uma proteína hipotética e uma proteína Rhs associada ao sistema de secreção tipo V. O domínio VRR-NUC e a lipoproteína da família YgdI/YgdR são compartilhadas entre *P. fluorescens* SRM1 e *P. fluorescens* MS82 em posições invertidas, devido provavelmente a um evento de recombinação gênica.

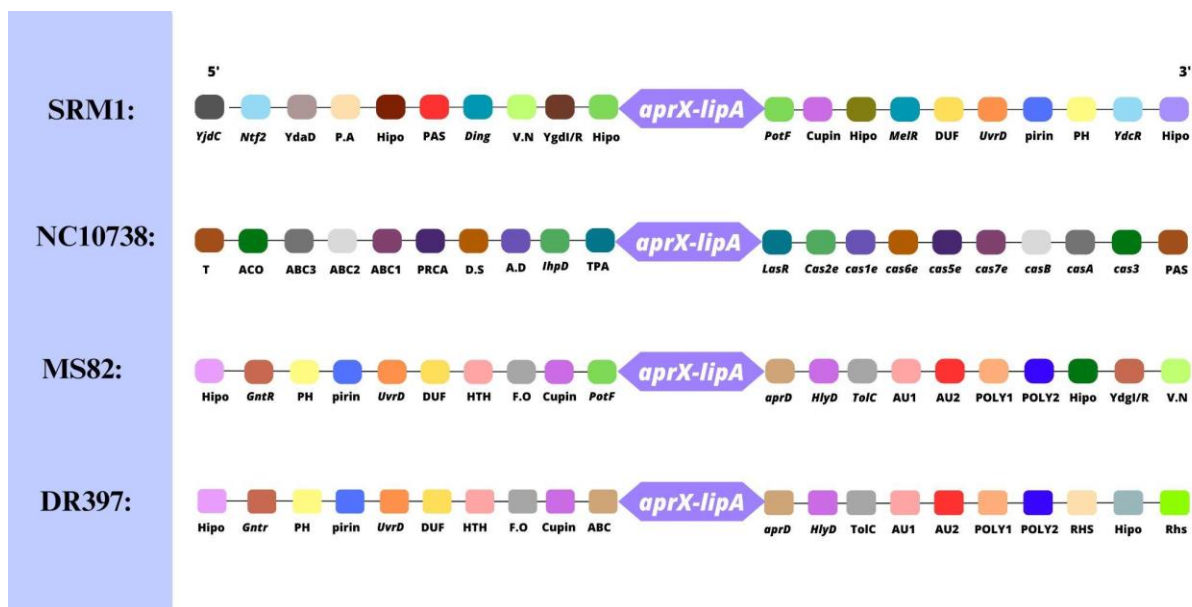


Figura 6. Genes e produtos proteicos à esquerda e direita do operon *aprX-lipA* dos isolados de *P. fluorescens*, tendo como referência o isolado SRM1.

No que diz respeito à constituição genética do operon da espécie tipo *P. fluorescens* SRM1, observamos a coexistência de dois precursores de lipases juntos no genoma desse isolado (*lipA-lipB*), o operon nesse organismo possui a seguinte organização: *lipB-lipA-prtB-prtA-aprF-aprE-aprD-inh-aprX*.

Os genes vizinhos localizados à esquerda do operon nesse isolado (Figura 6) são quase exclusivos em relação aos outros isolados, sendo composto por uma proteína hipotética - *YgdI/YgdR* - *VN*- *Ding* - *PAS* - hipo - antitransportador de potássio - *YdaD*- *Ntf2* - *YjdC*. As regiões VRR-NUC (*VN*) e *Ding* correspondem a uma helicase conservada que se relaciona com mecanismos de reparo de DNA, e a uma helicase que está ligada a processos de replicação e reparo de DNA respectivamente.

O gene *YjdC* é um regulador do domínio helix-turn-hélix (HTH), um domínio que está relacionado com a replicação, reparo e manutenção do DNA. No isolado lácteo identificamos dois reguladores de mesmo domínio em ambos extremos de sua vizinhança (Figuras 6).

A vizinhança localizada à esquerda do operon nos isolados ambientais também apresenta similaridades (Figura 6), com apenas a substituição do gene *potF* em *P. fluorescens* MS82 por um transportador do tipo ABC no isolado *P. fluorescens* DR397. Os genes, à direita, *hlyD* e *ToIC* são respectivamente um transportador relacionado à exotoxina hemolisina (*HlyA*) e o gene *toIC* faz parte do sistema de efluxo bacteriano.

Apesar da nomenclatura diferente, a análise das anotações evidenciam que os genes dos operons menos frequentemente citados apresentam funções semelhantes, nos grupos de *P. fluorescens*. A presença dos genes *aprDEF* está incompleta nos isolados ambientais (Figura 5). Apenas o isolado SRM1 possui os precursores de proteases prtAB. No isolado clínico NCTC10783, mais três transportadores da família ABC, mesma família de *aprDEF*, se encontram próximos ao conjunto do operon.

As metaloproteases apresentam identificações sinônimas no NCBI para os isolados *P. fluorescens* SRM1 e NCTC10738. Com base na análise de domínios protéicos nas anotações (Interpro), o transportador do sistema de secreção tipo I presente em *P. fluorescens* Dr397 e MS82 é o gene *aprD*, em ambos isolados, encontra-se separado por dois autotransportadores, que hipotetizamos serem os outros componentes do complexo *aprDEF*, pelos genes *HlyD* e *ToIC* que estão relacionados com o sistema de defesa desses organismos (Figura 6).

5.3 Contexto genômico do operon avaliado no String.

As sequências FASTA dos aminoácidos dos produtos proteicos do operon foram depositadas no banco de dados *String* para análise complementar do contexto genômico dos isolados selecionados. Na plataforma foram analisadas as co-expressões, co-ocorrências e os genes vizinhos do operon *aprX-lipA* nos isolados utilizados no estudo e nas outras espécies de *Pseudomonas*, com isso identificamos os seguintes resultados:

5.3.1 Gene Neighborhood

Na figura 7, observamos que, com relação aos genes constituintes do operon, o inibidor de protease *inh* (em rosa) e a proteína transportadora do sistema de secreção tipo I *aprD* (em roxo), são as que apresentam maiores padrões de conservação dentro do grupo estudado. Os outros componentes gênicos do operon em diferentes espécies de *Pseudomonas* apresentam seções de cores horizontalmente repartidas.

Os genes circunvizinhos aos operons em outras espécies de *Pseudomonas*, apresentaram similaridades com os vizinhos destacados nos genomas dos isolados de *P. fluorescens* estudados (Figura 7). As espécies que apresentaram uma co-vizinhança gênica mais recorrente foram *P. chlorapis*, *P. brassicacearum*, *P. borbori*, *P. entomophila* e *P. prosekii*, os mais recorrentes nessas espécies foram os genes *hlyD* e *tolC* envolvidos no sistema de defesa e o gene *lapA*, relacionado a formação de biofilmes. Os demais genes co-vizinhos presentes, por ora não foram correlacionados com segurança, em sua maioria são genes definidos como proteínas hipotéticas ou genes relacionados a transportadores de membrana.

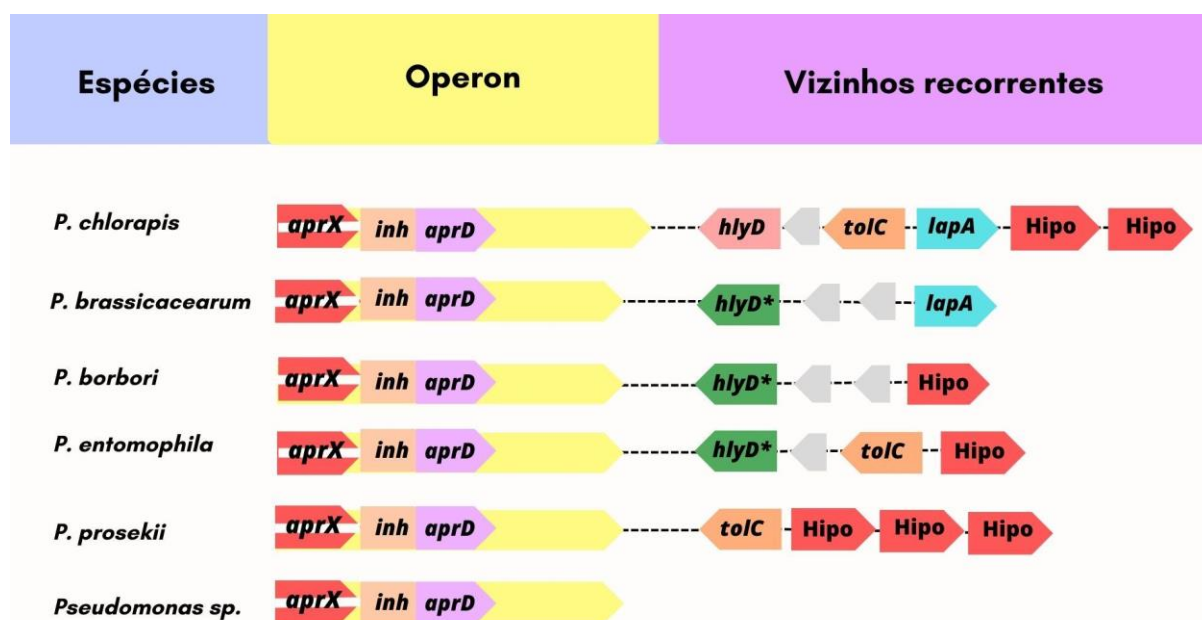


Figura 7. Espécies de *Pseudomonas* que apresentaram maiores similaridades quanto a co-vizinhança gênica do operon *aprX-lipA*: as linhas transversais no gene *aprX* indicam que sua ortologia é complexa; *hlyD** não são o componente HlyD mas se relacionam com ele; A posição das setas indicam o sentido 5' - 3' ou 3' - 5'

5.3.2. Co-ocorrência gênica do operon *aprX-lipA* entre diferentes espécies de *Pseudomonas*.

O padrão de co-ocorrência dos genes do operon (Figura 8) aparece mais conservado dentro do grupo *P. fluorescens*, baseado na densidade do gradiente de cores indicando similaridade entre os membros do grupo. Esse perfil de similaridade, no entanto, é gradativamente menor com a distância evolutiva entre as espécies de *Pseudomonas*. Os grupos não classificados (*unclassified group*) desse gênero (cerca

de 40 espécies), apresentaram as maiores similaridades com os isolados analisados, quanto à co-ocorrência do operon. As espécies *P. siringae*, *P. putida*, *P. chlorapis*, *P. aeruginosa*, *P. weihenstephanensis*, *P. brassicacearum*, *P. silesiensis*, *P. parafulva*, *P. batumici*, *P. prosekii*, *P. antarctica*, *P. koreensis* e *P. frederiksbergensis* foram as que apresentaram os maiores gradientes de similaridade conservativa com todos os genes do operon em *P. fluorescens*.

O inibidor de protease alcalina (*inh*), é o componente que apresenta os menores níveis de similaridade com outros organismos bacterianos, aparecendo quase que exclusivamente no complexo *P. fluorescens* e nos grupos de maior gradiente de similaridade entre os genes do operon *aprX-lipA* em *Pseudomonas*.

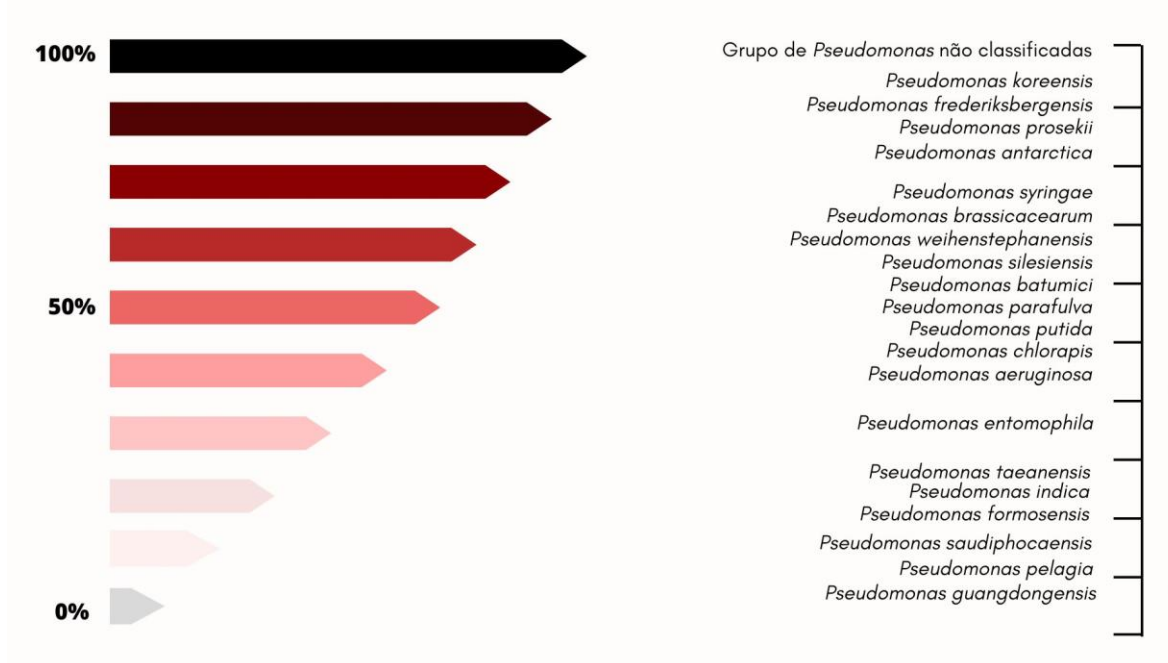


Figura 8. Índice de co-ocorrência dos genes de *aprX-lipA* no genoma de outras espécies de *Pseudomonas*, obtidos da plataforma *String*. Os padrões de similaridade entre os genes do operon são denotadas a partir de gradientes de cores que variam do branco, rosa, vermelho e preto. Quanto mais denso o gradiente de cores, mais similar e conservado é o gene nas outras espécies do gênero analisado.

5.3.3. Análise de co-expressão dos genes do operon *aprX-lipA* de diferentes espécies de *Pseudomonas*.

Por se tratar de um operon, as correlações em expressão e funcionalidade identificadas, na plataforma *String*, já eram conhecidas, como a co-expressão do gene *aprX* e seus precursores extracelulares *prtAB*. Em acréscimo, para detectar a relação de patogenicidade anotadas entre os genes *ToiC-HlyD* e os genes do operon *aprX-lipA* em *P. fluorescens*, depositamos as sequências dos aminoácidos desses na plataforma *String* para detectar padrões de co-expressão.

No retorno de dados analisados (Figura 10), o gene *HlyD* não apareceu adequadamente nomeado. Ele foi rotulado como *apxIB_1* (em vermelho). Podemos notar que há uma relação de co-expressão desse gene com homólogos do transportador de membrana *aprE* em várias espécies, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*, *Bordetella pertussis*, *Geobacter sulfurreducens*, *Nitrosomonas europaea*, *Salmonella enterica* e *Streptococcus pneumoniae*. Dentre esses isolados, *S. enterica* e *P. aeruginosa* apresentaram os maiores índices de correlação entre as duas proteínas avaliadas, com valores de 0.91 e 0.74,

respectivamente, indicando, um grau maior de confiança nas relações de co-expressão entre os genes *HlyD* e homólogos do transportador *aprE*.

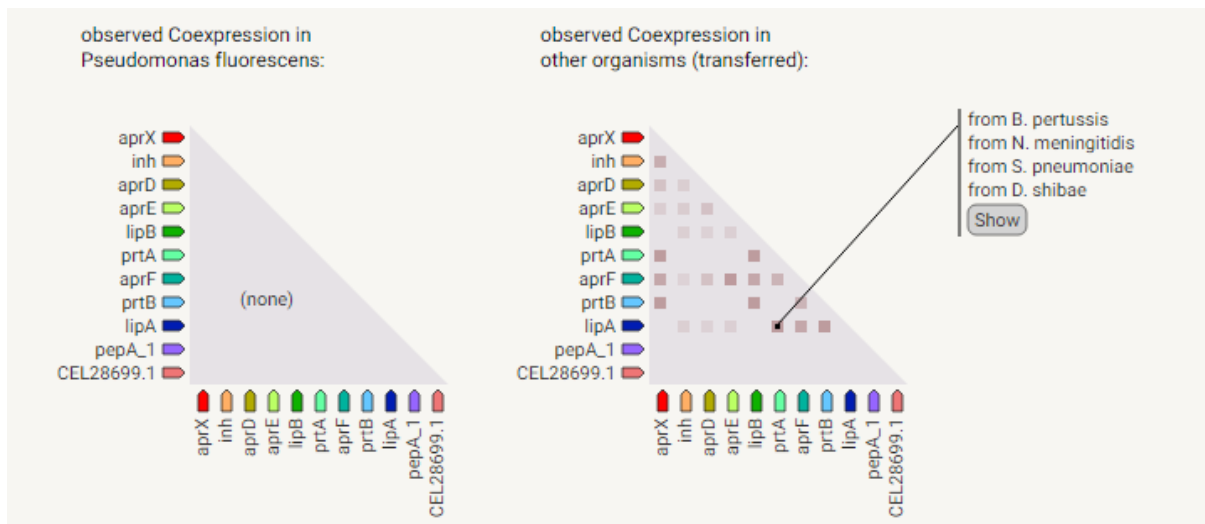


Figura 9. Avaliação de co-expressão entre os genes do operon *aprX-lipA* em grupos de *Pseudomonas* obtido através da plataforma String. Os padrões de co-expressão entre os genes são definidos pelo gradiente de cor dos quadrados inseridos na matriz triangular, quanto mais escuro for, maior a sua correlação em expressão e funcionalidade.

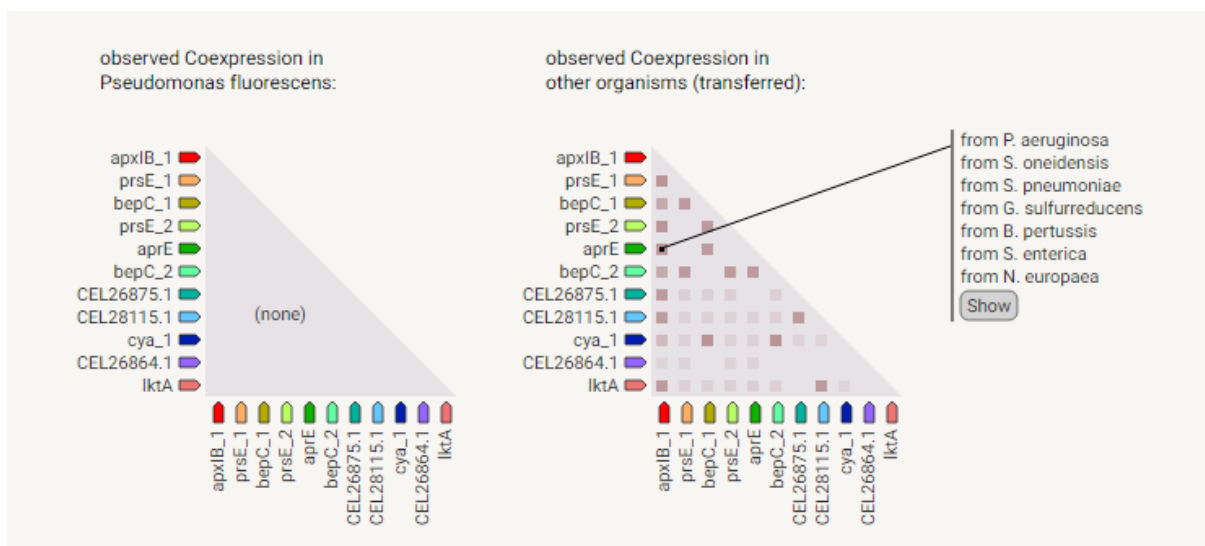


Figura 10. Taxa de co-expressão entre *HlyD* e *aprE* observados em grupos externos à *P. fluorescens* obtido através da ferramenta Coexpression da plataforma String.

6. DISCUSSÃO

Pseudomonas fluorescens é bem conhecida por ser a bactéria láctea mais importante encontrada como contaminante do leite não pasteurizado, recém ordenhado e recém refrigerado (Martins *et al.*, 2015). Sua capacidade proteolítica tem sido ligada à presença do gene *aprX*, um componente do operon *aprX-lipA* (Figura 2), que codifica uma metaloprotease alcalina termoresistente, sendo um dos principais fatores na deterioração das proteínas do leite cru recém ordenhado e refrigerado (Meier *et al.*, 2020).

Nesse estudo, avaliamos os genes vizinhos ao óperon *aprX-lipA* de isolados de *P. fluorescens* (figura 6) e comparamos a disposição gênica da vizinhança entre isolados de diferentes origens ambientais, clínicas e de leite, afim de avaliar se o contexto genômico do operon interfere diretamente na capacidade proteolítica do grupo.

A capacidade proteolítica da enzima *aprX* está ligado a sua atividade na catálise de ligações proteicas, eles degradam principalmente proteínas do tipo caseína pois possuem estruturas aleatórias não helicoidais. Outra característica ligada a sua alta proliferação é sua alta resistência a variações extremas de temperatura (Martins *et al.*, 2005; Martin, *et al.* 2021).

Em um estudo com bactérias psicrotóricas isoladas de leite não pasteurizado (Araújo *et al.*, 2019), foi identificado que todas as cepas de *Pseudomonas* sp que atuavam na degradação do leite carregam o gene *apr* codificadora da metaloprotease alcalina *aprX*.

No entanto segundo o exposto por Longhi *et al.* (2020) com isolados de *P. fluorescens* e *P. putida*, duas das grandes contaminantes do leite, o gene *aprX* não apontou uma ligação direta entre a expressão de atividade deteriorante apresentado por essas cepas à presença do gene *aprX*.

Na análise dos genes vizinhos (Figura 6) conseguimos discernir conjuntos específicos de genes que constituem os vizinhos ao operon *aprX-lipA*. É interessante notar que esses conjuntos genéticos se manifestam de maneira mais frequente no isolado proveniente de ambiente de solo (*P. fluorescens* MS82) e no isolado extraído de plantações de soja (*P. fluorescens* DR397). Nesses organismos, a presença de mesmos genes, com certa variação quanto sua posição, em ambos os lados do

operon, formam um padrão conservado altamente significativo presente nesses dois organismos específicos .

O gene *aprX* codificante da metaloprotease alcalina nas outras espécies de *Pseudomonas* aparenta possuir uma história evolutiva mais complexa (Figura 7). Possivelmente, a estrutura dessa proteína em outros grupos bacterianos do gênero pode ser variável, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Mutações presentes no gene codificante da enzima também podem estar envolvidos na sua eficiência diferencial dentro dos grupos de *Pseudomonas*, esses fenômenos geralmente estão relacionados com perda de funções da enzima ou até mesmo inativação de sua atividade (Gonzaga., 2006).

As variações evidenciadas na organização das ortologias genéticas nos bancos de dados também são fatores que podem resultar em histórias evolutivas difusas, como observadas, por exemplo variações sinônimas na nomenclatura dos genes, proteínas hipotéticas e a variação de domínios incompletos. Esta limitação se traduz na ausência de correlações fidedignas entre as estruturas enzimáticas de tais grupos, indicando a necessidade de uma análise plural de metodologias.

Devemos ressaltar, que a região do operon nos isolados de *P. fluorescens* estudados apresenta alto nível de variabilidade. Por essa razão, possuem anotações divergentes, às vezes, com baixa acurácia e baixa precisão. Futuramente, a realização de análises domínio a domínio dos genes estudados, explorando as variações interespecíficas observadas no grupo, pode ajudar a identificar qualitativamente essas estruturas, desvendando a complexidade para uma melhor compreensão da região.

Segundo Maier *et al* (2020), os operons *aprX-lipA* presentes em *Pseudomonas* sp. possuem uma grande variedade organizacional (Figura 3), cerca de 22 variações diferentes para o operon foram registradas, muitos dos componentes genéticos não estavam presentes no genoma ou estavam localizados numa porção diferente do genoma, e alguns genes e proteínas não possuíam mais atividade. Diferentemente dos isolados *P. fluorescens* SRM1 e NCTC10738, o operon nos isolados extraídos do solo e soja *P. fluorescens* DR397 e MS82, foram identificados com presença parcial dos genes de transporte *aprDEF*, os precursores extracelulares de serina protease (*prtAB*) só foram observados na espécie tipo SRM1. Os genes codificantes da protease *aprX*, do inibidor de atividade enzimática *inh* e do transportador pertencente ao sistema de secreção tipo I *aprD* foram observados em todos os isolados utilizados

neste estudo. Os genes menos observados foram os precursores de serina protease *prtAB*, que só se encontravam presentes na espécie láctea, esses genes podem estar localizados em outras regiões do genoma dos isolados *P. fluorescens* MS82, Dr397 e NCTC10738 (Tabela 1). Assim, a análise de genes com potencial de mecanismo de defesa e patogenicidade do grupo de operons estudado precisa ser analisada individualmente, isolado a isolado.

A estrutura do operon *aprX-lipA* já foi objeto de vários estudos pelo mundo, de acordo com Aguilera et al. (2023), que realizou teste proteolítico com diferentes tipos de operon, identificou que a conformação *aprX-aprI-aprDEF-prtAB-lipA* apresentou atividade deteriorante mais expressiva do que outras configurações apresentadas no estudo, indicando como a organização gênica do operon é importante para sua funcionalidade proteolítica.

Na análise de co-ocorrência do operon em outros grupos bacterianos dentro do gênero *Pseudomonas*, (Figura 8), observamos como os genes que o compõem apresentam co-ocorrência variável fora do complexo *P. fluorescens*. Os gradientes de cores que representam as concentrações são mais uniformes dentro do complexo, enquanto em outras espécies os níveis apresentam maior diferenciação entre si. Isso sugere uma possível organização exclusiva do operon dentro do complexo *P. fluorescens*. Todavia, quando analisados individualmente os nucleotídeos contra bancos de nucleotídeos, nas análises preliminares, o retorno da sequência (NCBI) mostrou maior identidade com o genoma de *Bacillus subtilis*. Indicando a necessidade de uso de múltiplas ferramentas de filogenia e evolução molecular.

Duong et al. (1997) estabeleceu a importância dos genes *aprDEF* para o transporte, que são essenciais para a transposição adequada de proteases e principalmente lipases para o meio extracelular. A variabilidade desses genes no operon dos isolados analisados, parece estar ligada às necessidades evolutivas próprias de cada isolado. Observamos, que os organismos sem os transportadores compondo o operon, não apresentaram os genes *lipA* e *lipB* codificantes de lipases. No entanto as posições dos genes mais comuns no operon parecem ser estáveis nos isolados estudados, como por exemplo, os genes codificadores de protease, do inibidor de protease *inh* e o transportador *aprD* que estão presentes nos genomas (Figura 8).

Localizamos as regiões do domínio HTH "*helix-turn-helix*" presente na região 3,111,047-3,111,862 no isolado *P. fluorescens* MS82 e 3,378,594-3,379,409, *P.*

fluorescens DR397 e seus reguladores transcricionais *GntR* que possuem domínio HTH. Esses genes estão relacionados com ligação de DNA e sua replicação, processos de reparo, mobilidade celular, utilização de glicose, resistência bacteriana e virulência (Bhattacharyya & Keck, 2015).

Dentro do contexto da bactéria láctica estudada, descobrimos a presença de reguladores transcricionais que possuem domínio HTH posicionados nas extremidades do operon em seu genoma (Figura 6). Em específico, os genes *YdcR* à direita do operon *aprX* e *YjdC* na extremidade esquerda. Essa disposição infere uma visão intrigante sobre a regulação da expressão dos genes vizinhos. A presença de tais reguladores e domínios relacionados com a expressão de genes, replicação de DNA e outros mecanismos de manutenção dos ácidos nucleicos pode indicar que esta região genômica pode ser alvo de uma rede regulatória mais específica desse isolado, que pode estar se relacionando com o nível de expressividade e conservação do operon *aprX-lipA* em *P. fluorescens* SRM1.

Foi observada uma maior similaridade genética entre os isolados extraídos do ambiente, como solo e soja, do que aqueles provenientes do leite (Figura 6). Esses últimos, estão relacionados com a principal via de contaminação deste alimento, estreitamente, associada à contaminação de equipamentos de ordenha por microrganismos ambientais, onde *P. fluorescens* é presença de destaque (Paulo *et al.*, 2021). A falta de procedimentos de higienização adequada dos equipamentos utilizados durante o processamento do leite, a carência de práticas sanitárias rigorosas para manutenção da qualidade da água utilizada na limpeza desses equipamentos, assim como o descuido no trato dos recintos onde são mantidos os animais e locais de refrigeração do leite, desempenham um importante papel no perfil contaminante desempenhado por essa bactéria, chama a atenção dos autores.

Os padrões de similaridade e variações estudados denotam a importância de uma política de vigilância sanitária constante e regulação do processo industrial de alimentos, que possam acompanhar o desenvolvimento evolutivo dos microrganismos. As modificações estruturais e funcionais relacionadas ao genoma dos isolados presentes no estudo possuem implicações diretas na qualidade dos alimentos, no entanto os mecanismos relacionados a este potencial deteriorante ainda carecem de informações aprofundadas. Entender sua história permite atuar contra a proliferação desses organismos e sua alta atuação na degradação do leite e

seus derivados quando necessário. Auxiliando na promoção de medidas preventivas e que garantam a qualidade dos insumos.

Baseados nisso, entendemos que o processo de desencorajamento de medidas de vigilância sanitária devem ser repudiados e combatidos (Pires *et al.*, 2022). Uma investigação sanitária suprimida possui o potencial de gerar riscos significativos à qualidade e segurança alimentar. Em vez disso, deve ser investido a aplicabilidade de normas de controle e a realização de vigilância mais robusta para garantir a saúde da população e evitar grandes impactos de saúde e na indústria.

Casos de infecções relacionadas à *P. fluorescens* geralmente estão ligadas a quadros clínicos relativos a doenças do sistema respiratório. Em um relato de caso Liu (2021) relaciona um caso clínico, em idoso, de pneumonia por infecção de *P. fluorescens*. Outros casos foram relatados em pacientes que realizaram transplantes pulmonares (Dickson *et al.*, 2014), que possuíam quadros de pneumonia associada à ventilação mecânica (Bahrani *et al.*, 2007), fibrose cística (Heirali *et al.*, 2016) e também em casos de afogamento em campos de arroz (Yamawaki *et al.*, 2016).

O isolado *P. fluorescens* NCTC10738 foi extraído do trato respiratório humano (Tabela 1) e possui um sistema CRISPR tipo 1 bem definido em seu genoma, próximo à região do operon (Figura 6). Esse mecanismo é capaz de reconhecer sequências alvo mais longas do que, o já bem conhecido, CRISPR cas9. Podendo induzir mutações, que envolvem deleções em várias quilobases, dentro do contexto genômico em que estiver inserido. Além disso, possui múltiplas proteínas Cas responsáveis pela clivagem de DNA, enquanto o sistema CRISPR tipo II, utiliza apenas uma (Yoshimi & Mashimo, 2022).

A similaridade funcional observada na vizinhança do operon *aprX-lipA* nos organismos estudados, indica maior proximidade entre os isolados *P. fluorescens* NCTC10738, DR397 e MS82, se comparadas à espécie tipo *P. fluorescens* SRM1 (Figura 6). Existem ao menos duas hipóteses: O isolado tipo SRM1 recebeu parte desses genes por duplicação e inversão de um segmento cromossômico e/ou transferência horizontal. Enquanto, NCTC10738, DR397 e MS82 podem ter perdido antes da divergência de seu ancestral comum.

Nesses organismos, os genes que compõem a vizinhança do operon estão relacionados ao sistema de defesa bacteriano, como a presença de bombas de efluxo e precursores de exotoxinas (*ToiC/HlyD*) nos isolados de soja e solo, enquanto no isolado clínico está relacionado com o sistema CRISPR. Em contraste, o isolado

SRM1 apresenta os produtos gênicos circunvizinhos relacionados aos mecanismos de regulação de expressividade e metabolismo da molécula de DNA (Figura 6).

Todavia, é possível relacionar que o genoma com um maior número de genes mais específicos do operon apresenta um maior potencial deteriorante de leite. A realização de uma análise comparativa futura entre genomas de isolados extraídos do leite, pode fornecer insights que comprovem essa hipótese.

Além da metaloprotease *aprX*, observamos uma outra de mesma família denominada *aprA* ligada ao gene de inibidor de protease no operon do isolado *P. fluorescens* NCTC10738 (Figura 5). Esta protease também nomeada *aprA* em *Pseudomonas aeruginosa*, em bactérias psicrófilas *aprX* e *aprA* são funcionalmente idênticas, enquanto em *P. aeruginosa* elas produzem proteínas diferentes (Guzzo *et al.*, 1991; Duong *et al.*, 2001). Os sistemas de transporte *aprDEF* estão presentes, o que garante uma boa transposição das proteases para o meio extracelular. Nesse sentido, uma vez que esses genomas entrem em contato aumenta a probabilidade de transferências gênicas, sejam patogênicas ou não.

A classe de enzimas que realizam atividade proteolítica estão relacionados com a patogênese de diversos microrganismos (Frees *et al.*, 2013). A virulência potencial da protease *aprX* já foi indicada *P. fluorescens* (Zhang *et al.* 2007), relacionadas com o aparecimento da “Doença da pele vermelha” em peixes, inviabilizando o consumo de sua carne.

Os genes *HlyD* e *ToIC* estão presentes à direita do operon no genoma de *P. fluorescens* DR397 e MS82 (Figura 6), são genes ligados ao sistema de defesa bacteriano em alguns grupos como *E. coli* e *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2012). Esses elementos possuem importância clínica, tendo em vista que esses mecanismos conferem resistência à antimicrobianos, e fazem parte do sistema de transporte de hemolisina A (*HlyA*) em *E. coli*. *HlyA* é uma exotoxina capaz de lisar a parede celular dos hospedeiros, no processo de patogênese, enquanto, *ToIC* é relevante para os sistemas de defesa. Estudos anteriores demonstraram que a ausência desse componente nos organismos bacterianos torna-os mais sensíveis à pequenas quantidades de detergente (Lee *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2014). Na natureza esse sistema está relacionado com a proteção das bactérias contra toxinas, no contexto da saúde pública esse mecanismo possui alta relevância clínica pois está ligado à resistência contra antibióticos.

A co-expressão gênica, o gene *HlyD* presente nos isolados MS82 e DR397 pode apresentar certa afinidade funcional com o transportador *aprE* em grupos externos à *P. fluorescens* (Figura 10). Isso é possível porque, esse gene está associado aos transportadores do sistema de secreção tipo I. Se uma relação de coexpressão entre esses dois genes estiver ocorrendo no genoma dos isolados estudados, pode-se sugerir que o operon *aprX-lipA* desses organismos pode estar envolvido não apenas na atividade proteolítica e lipolítica, mas também da promoção dos mecanismos de defesa bacteriano. Nesse sentido, a realização de estudos laboratoriais mais aprofundados é essencial para avaliar uma possível interação entre *aprDEF* e o sistema *HlyD/ToIC* no contexto de *P. fluorescens*. Pode-se assim, fornecer novas idéias sobre a possível conexão funcional entre esses componentes, indicando como eles podem estar interagindo para influenciar a fisiologia dos isolados de *P. fluorescens*, assim, auxiliando na compreensão das estratégias adaptativas adotadas por esses isolados, em resposta a desafios ambientais e à pressão seletiva.

A necessidade de mais análises genotípicas relacionados aos mecanismos de patogenicidade de *P. fluorescens*, foi levantada anteriormente (Silverio *et al.*, 2022), baseando-se na investigação dos mecanismos de resistência a antimicrobianos deste grupo. Foi constatado que muitos fenótipos de multirresistência podem estar relacionados a características genotípicas intrínsecas da espécie, enquanto outros podem ter caráter adaptativo, sendo necessário a realização de mais ensaios fenotípicos e genotípicos para elucidar eficientemente sua característica de resistência.

A diversidade genotípica interespecífica identificada nos isolados de *P. fluorescens* estudados, sugere que características apontadas como patogênicas, não são comuns a todos os membros. Isso implica que cada indivíduo de *P. fluorescens* aqui abordado possui características únicas da região do operon e circunvizinhas. Comportamento parecido foi identificado numa análise de genômica comparativa de *Streptococcus infantarius* por Brito *et al.* (2022), que constataram que as características patogênicas da espécie estudada se encontravam dispostas de forma única entre os indivíduos. Portanto, cada genoma dos isolados deve ser avaliado de forma individual, com ênfase nas variações presentes a nível do indivíduo.

7. CONCLUSÃO

A dinâmica da organização do operon *aprX-lipA* e seus genes circunvizinhos moldados pela evolução organizaram combinações gênicas com potencial proteolítico diversos.

A análise do contexto genômico nos mostrou que a estrutura da protease *aprX* relacionada ao operon e a região estudada, é mais complexa do que se conhecia anteriormente, variando qualitativamente e quantitativamente.

A observação de co-ocorrência desse operon em outros grupos do gênero *Pseudomonas*, indicou que o operon *aprX-lipA* em *P. fluorescens* pode ter se organizado de maneira específica, ainda não detectado em outros genomas completos disponíveis.

A investigação da taxa de co-expressão gênica identificou uma relação entre os genes *hlyD* e *aprE*.

O operon nos quatro isolados apresentaram variações, nos isolados lácteo e clínico ele está invertido, os isolados ambientais apresentam configurações organizacionais idênticas.

Os genes circunvizinhos ao operon nos isolados ambientais possuem padrões de similaridade observados, eles também compartilham certos níveis de conservação gênica com o isolado lácteo SRM1

Identificamos o sistema CRISPR tipo 1 na região da co-vizinhança do operon no isolado clínico de *P. fluorescens*, com relação ainda não relatada na literatura.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, R. E. et al. Effect of a Heat-Resistant Microbial Lipase on Flavor of Ultra-High-Temperature Sterilized Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 3, p. 375–379, mar. 1981.

AGUILERA-TORO, M. et al. Proteolytic activity and heat resistance of the protease AprX from *Pseudomonas* in relation to genotypic characteristics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 391-393, p. 110147, 16 abr. 2023.

AKIYAMA, K. et al. Roles of the membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. **eLife**, v. 4, 8 out. 2015.

ALYA HEIRALI et al. Assessment of the Microbial Constituents of the Home Environment of Individuals with Cystic Fibrosis (CF) and Their Association with Lower Airways Infections. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148534–e0148534, 9 fev. 2016.

BAHRANI-MOUGEOT, F. K. et al. Molecular Analysis of Oral and Respiratory Bacterial Species Associated with Ventilator-Associated Pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1588–1593, 14 fev. 2007.

BIAGGINI, K. et al. The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 8, p. 983–990, 1 out. 2015.

BRITO, L. P. D. et al. In silico evaluation of genomic characteristics of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* for application in fermentations. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 94, n. suppl 3, p. e20211447, 2022.

CULP, E.; WRIGHT, G. D. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 4, p. 366–377, 1 abr. 2017.

CRONAN, JOHN E. The structure of lipoyl synthase, a remarkable enzyme that performs the last step of an extraordinary biosynthetic pathway. **Biochemical Journal**, v. 464, n. 1, p. e1–e3, 23 out. 2014.

EMIOLA, A.; GEORGE, J.; ANDREWS, S. S. A Complete Pathway Model for Lipid A Biosynthesis in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 28 abr. 2015.

FREES, D.; BRØNDSTED, L.; INGMER, H. Bacterial proteases and virulence. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 66, p. 161–192, 2013.

FROHBIETER, K. A. et al. Effects of *Pseudomonas fluorescens* M3/6 Bacterial Protease on Plasmin System and Plasminogen Activation. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3392–3401, out. 2005.

HEIRALI et al. Assessment of the Microbial Constituents of the Home Environment of Individuals with Cystic Fibrosis (CF) and Their Association with Lower Airways Infections. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148534–e0148534, 9 fev. 2016.

HENDRICKS, A. L. et al. Characterization and Reconstitution of Human Lipoyl Synthase (LIAS) Supports ISCA2 and ISCU as Primary Cluster Donors and an Ordered Mechanism of Cluster Assembly. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1598–1598, 5 fev. 2021.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays in Biochemistry**, v. 38, p. 1–8, 1 out. 2002.

INGMER, H.; BRØNDSTED, L. Proteases in bacterial pathogenesis. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 9, p. 704–710, nov. 2009.

ISEPPI, R. et al. Virulence Factors, Drug Resistance and Biofilm Formation in *Pseudomonas* Species Isolated from Healthcare Water Systems. **Current Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 1737–1745, 21 abr. 2020.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S. S. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 4999–5009, nov. 2010.

JUN, S.-R. et al. Diversity of *Pseudomonas* Genomes, Including Populus-Associated Isolates, as Revealed by Comparative Genome Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 375–383, 1 jan. 2016.

LALUCAT et al. Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. **Genes**, v. 11, n. 2, p. 139, 29 jan. 2020.

LAMPUGNANI, C. et al. Quantification of psychrotrophic bacteria and molecular identification of *Pseudomonas fluorescens* in refrigerated raw milk. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019.

LEE, M. et al. Membrane Fusion Proteins of Type I Secretion System and Tripartite Efflux Pumps Share a Binding Motif for TolC in Gram-Negative Bacteria. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40460, 6 jul. 2012.

LIU, X. et al. Pneumonia caused by *Pseudomonas fluorescens*: a case report. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 21, n. 1, 5 jul. 2021.

LONGHI, R. D. et al. Presence of aprX gene in *Pseudomonas* spp. from refrigerated raw milk and their proteolytic ability. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 41, n. 4, p. 1421, 13 maio 2020.

MAIER, C. et al. Simultaneous quantification of the most common and proteolytic *Pseudomonas* species in raw milk by multiplex qPCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 4, p. 1693–1708, 1 fev. 2021.

MARTINS, M. L. et al. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 207–217, 31 mar. 2015.

MIGUEL, E. M. et al. Multiplicação de *Pseudomonas fluorescens* em temperaturas de refrigeração e seu potencial proteolítico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 74, n. 2, p. 96–107, 18 jun. 2019.

OLSEN, J. V.; ONG, S.-E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 3, n. 6, p. 608–14, 2004.

MILLER, J. M. et al. Escherichia coli LipA Is a Lipoyl Synthase: In Vitro Biosynthesis of Lipoylated Pyruvate Dehydrogenase Complex from Octanoyl-Acyl Carrier Protein. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15166–15178, 10 nov. 2000.

PAULO, I. DE A.; MONTANHINI, M. T. M.; RIBEIRO, L. F. CONSEQUÊNCIA DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS EM LEITE E DERIVADOS. **Revista GeTeC**, v. 10, n. 25, 23 fev. 2021.

PROOST, P. et al. Chemokine isoforms and processing in inflammation and immunity. **Science Direct** v. 85, p. 45–57, 1 dez. 2017.

RAUH, V. M. et al. Plasmin Activity in UHT Milk: Relationship between Proteolysis, Age Gelation, and Bitterness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6852–6860, 7 jul. 2014.

SCALES, B. S. et al. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 927–948, out. 2014.

SILBY, M. W. et al. Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652–680, jul. 2011.

SILVERIO, M. P. et al. Pseudomonas fluorescens Complex and Its Intrinsic, Adaptive, and Acquired Antimicrobial Resistance Mechanisms in Pristine and Human-Impacted Sites. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 985, 1 ago. 2022.

STOECKEL, M. et al. Growth of Pseudomonas weihenstephanensis, Pseudomonas proteolytica and Pseudomonas sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. **International Dairy Journal**, v. 59, p. 20–28, ago. 2016.

THOMAS, S.; HOLLAND, I. B.; SCHMITT, L. The Type 1 secretion pathway — The hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1843, n. 8, p. 1629–1641, 1 ago. 2014.

YAMAWAKI, S. et al. Rice-Field Drowning-Associated Pneumonia in which *Pseudomonas* spp., *Aspergillus fumigatus*, and *Cunninghamella* sp. Are Isolated. **Internal Medicine**, v. 55, n. 7, p. 825–829, 2016.

ZERVOS, M.; NELSON, M. Cefepime versus Ceftriaxone for Empiric Treatment of Hospitalized Patients with Community-Acquired Pneumonia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 729–733, 1 abr. 1998.

ZHANG, W. et al. Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 183–188, out. 2009.