



Marina Alexandra Carriço Bonifácio
Licenciada em Biotecnologia

**Transformação Natural em *Arcobacter
butzleri***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira,
CICS-UBI

Coorientador: Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro, INSA

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Arguente: Doutora Joana Rita Gonçalves Araújo Rolo Mateus
Vogal: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

setembro 2018

Marina Alexandra Carriço Bonifácio

Licenciada em Biotecnologia

**Transformação Natural em *Arcobacter
butzleri***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
Bioquímica, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientador:

Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira

Coorientadora:

Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

setembro
2018

Transformação Natural em *Arcobacter butzleri*

Copyright Marina Alexandra Carriço Bonifácio, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, à Doutora Susana Ferreira, por me ter aceite no seu grupo de trabalho, pelo apoio incondicional, paciência, mas sobretudo pelo entusiasmo e disponibilidade de me ensinar, motivando-me sempre a melhorar, muito obrigada pelo conhecimento que me transmitiu. Às minhas coorientadoras, à Professora Fernanda Domingues e à Doutora Mónica Oleastro pelo apoio e disponibilidade que me deram sempre necessitei. Ao Ângelo pela energia positiva que me transmitiu no laboratório, pelo apoio e palavras amigas sempre que foram precisas.

Gostava de agradecer à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela formação que me proporcionou neste ano de mestrado.

Há percursos que não se fazem sem amizade e este é sobretudo um deles. Serei eternamente grata à cidade da Covilhã sobretudo à Universidade da Beira Interior pelas pessoas maravilhosas com quem me cruzei nesta caminhada. Quero agradecer especialmente ao grupo da “Salinha”, por terem sido as pessoas mais incríveis que conheci desde que entrei na Universidade, obrigada pelos bons momentos que passámos juntos e por fazerem deste ano, um ano inesquecível. Quero agradecer especialmente à Diana e à Carla pelas vezes que me fizeram companhia até tarde no laboratório, pelos abraços que me deram sempre que precisei, mas sem dúvida pela vossa amizade, que é para mim o mais precioso e o que vou guardar para sempre. À Jane por ter sido a minha confidente, pelos seus conselhos, mas sobretudo pela pessoa maravilhosa que é. À Dalinda, que mesmo sendo pequena em tamanho, tem um coração gigante, obrigada pelas risadas mesmo nos momentos mais complicados. À Rita que para além de colega de laboratório foi uma amiga incrível, por toda a ajuda disponibilizada, pelos seus conselhos e conhecimento partilhado, um muito obrigado. À Martinha por me ter ensinado a ver sempre o lado positivo em tudo e pelo tempo que perdeu para me ajudar sempre que necessitei. Por fim à Débora, à Catarina Almeida, ao Jorge e ao Diogo, pela amizade e bons momentos que ficam para sempre guardados.

Aos amigos que trouxe da UBI, Catarina e Rui e à melhor amiga que conheci na FCT, a Margarida, um muito obrigado, pelo apoio nos momentos mais difíceis, mas principalmente pelos bons momentos, cusquices e gargalhadas partilhadas, que vou guardar para sempre.

A toda a minha família, mas sobretudo à minha mãe Helena e ao meu pai Luís, por sempre me terem proporcionado a oportunidade de realizar os meus sonhos, pelo apoio incondicional mesmo estando longe, obrigada por sempre acreditarem em mim e me ensinarem a nunca desistir, sou-vos eternamente grata. Também à minha avó Jesus por estes 6 anos de faculdade que com ela passei, obrigada por sempre me ter proporcionado um sorriso quando precisei.

Por último, mas a pessoa mais importante da minha vida, ao meu Avô João, que mesmo já não estando presente fisicamente, foi sempre o meu pilar e sobretudo a pessoa que nunca duvidou que eu era capaz. Porque tenho a certeza de que ficarias orgulhoso da tua “Senhora doutora”, a ti Avô dedico esta tese, pela força que sempre me deste e pelo orgulho que permanentemente demonstraste que tinhas de mim.

Abstract

Arcobacter butzleri is, within the genus *Arcobacter*, the most frequent species associated with diarrheal diseases in humans, as well as, with bacteraemia in a few cases. *A. butzleri* demonstrates a high genetic diversity that likely contributes to its high adaptive capacity to the different environments where it can be found. One of the mechanisms contributing to this genetic diversity may be the horizontal gene transfer through natural transformation, which is characterized by the absorption, incorporation and functional expression of exogenous DNA that can occur under natural growth conditions. Aiming to clarify if *A. butzleri* is naturally competent for transformation and which factors may influence this process, different transformation procedures were tested, by using exogenous and isogenic DNA containing antibiotic resistance markers. It was shown that four *A. butzleri* strains among the five tested demonstrated to be naturally transformable, with a maximum frequency of 10^{-5} transformants per recipient cell, obtained after five days of incubation. It was observed that competence is maintained from exponential to stationary growth phases and that the optimal conditions for transformation were the use of 1 μ g of isogenic DNA, and incubation conditions at 30°C under a microaerophilic atmosphere. Also, *A. butzleri* favours the transformation of genetic material of its own strain/species. Moreover, the incorporation process occurs promptly after the addition of genomic DNA. Finally, it has been found that *A. butzleri* can exchange genetic material in co-cultures. In sum, horizontal gene transfer mediated by natural transformation is one of the processes that likely contributes to the genetic diversity of *A. butzleri*, and it is possible to be used as a tool for further genetics studies.

Keywords: *Arcobacter butzleri*; Natural transformation; horizontal gene transfer

Resumo

Arcobacter butzleri é, dentro do género *Arcobacter*, a espécie mais frequentemente associada a quadros diarreicos em humanos, bem como a alguns casos de bacteriemias. *A. butzleri* demonstra uma elevada diversidade genética, o que poderá contribuir para o aumento da sua capacidade adaptativa aos diferentes ambientes onde pode ser encontrado. Um dos mecanismos que contribui para a diversidade genética, poderá ser a transferência horizontal de genes, através do processo de transformação natural, que é caracterizado pela absorção, incorporação e expressão funcional de DNA exógeno, e que pode ocorrer em condições normais de crescimento. Assim, de modo a esclarecer se *A. butzleri* é naturalmente competente para transformação e quais os fatores que influenciam este processo, foram testados diferentes protocolos de transformação, com a utilização de DNA exógeno e isogénico contendo marcas de resistência a antibióticos. Foi possível verificar neste trabalho que quatro das cinco estirpes de *A. butzleri* estudadas foram naturalmente transformáveis, com uma frequência de transformação máxima obtida de 10^{-5} transformantes por célula recetora, obtida após 5 dias de incubação. Confirmou-se ainda que a competência se mantém desde a fase exponencial à fase estacionária de crescimento, e as melhores condições de transformação demonstraram ser a utilização de 1 µg de DNA isogénico, com incubação a 30°C e sob uma atmosfera de microaerofilia. *A. butzleri* também demonstrou favorecer a incorporação de material genético da sua estirpe/espécie. Observou-se ainda que o processo de incorporação de gDNA ocorre logo após a sua adição. Finalmente, verificou-se que *A. butzleri* tem a capacidade de trocar material genético em coculturas. Em suma, a transferência horizontal de genes mediada por transformação natural é provavelmente um dos processos que contribui para a diversidade genética em *A. butzleri*, sendo que esta ferramenta pode ser usada para estudos genéticos desta espécie.

Palavras-chave: *Arcobacter butzleri*; transformação natural; transferência horizontal de genes,

Comunicações Científicas

Comunicação oral de parte deste trabalho de Mestrado

- **Bonifácio M.**, Oleastro M., Domingues F., Ferreira S. "Transformação Natural em *Arcobacter butzleri*", XIII Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal- 5-6 de julho 2018

Índice

Capítulo 1- Introdução.....	1
1.1. Gênero <i>Arcobacter</i>	1
1.2. <i>Arcobacter butzleri</i>	3
1.2.1. Relevância clínica e patogenicidade de <i>Arcobacter butzleri</i>	4
1.2.2. Vias de transmissão de <i>Arcobacter butzleri</i>	5
1.2.3. Resistência de <i>Arcobacter butzleri</i> a compostos antibacterianos.....	6
1.3. Transferência Horizontal de genes.....	7
1.4. Transformação natural.....	8
1.4.1. Desenvolvimento de competência bacteriana.....	10
1.4.2. Captura de DNA exogênico.....	11
1.4.2.1. Ligação do DNA.....	12
1.4.2.2. Absorção e processamento do DNA	12
1.4.3. Integração do DNA no cromossoma.....	14
Capítulo 2- Objetivos.....	15
Capítulo 3 - Material e métodos.....	17
3.1. Estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i>	17
3.2. Armazenamento e condições de crescimento das estirpes.....	17
3.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	18
3.4. Obtenção de material genético a usar na transformação natural	18
3.4.1. Extração de DNA genômico	18
3.4.2. Amplificação do fragmento do gene <i>gyrA</i>	19
3.4.3. Amplificação da sequência portadora do gene que confere resistência à canamicina.....	19
3.5. Avaliação de protocolos de transformação natural de <i>Arcobacter butzleri</i>	21
3.5.1. Métodos de transformação natural, com utilização de protocolos em meio sólido	21
3.5.1.1. Método A.....	21
3.5.1.2. Método B.....	22
3.5.1.3. Método C.....	22
3.5.1.3.1. Efeito da temperatura e das condições atmosféricas na frequência de transformação.....	23
3.5.1.3.2. Transformação de diferentes estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i>	23
3.5.2. Métodos de transformação natural, com utilização de protocolos em meio líquido.....	23
3.5.3. Métodos de transformação natural, com utilização de protocolo em sistema bifásico.....	24
3.6. Determinação das curvas de crescimento das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1 e DQ40A1 Δ <i>cmeB</i>	24
3.7. Transformação de <i>Arcobacter butzleri</i> com diferentes materiais genéticos.....	25
3.8. Curva de saturação pela concentração DNA exógeno	25
3.9. Avaliação da influência da fase de crescimento na transformação de <i>Arcobacter butzleri</i>	25
3.10. Cinética de transformação	26
3.11. Efeito da presença de DNA competidor na transformação de <i>Arcobacter butzleri</i>	26
3.12. Troca de material genético entre coculturas bacterianas	27
Capítulo 4- Resultados e discussão	29
4.1. Suscetibilidade aos antibióticos	29

4.2.	Avaliação de diferentes protocolos de transformação natural	30
4.2.1.	Transformação natural em meio sólido.....	30
4.2.1.1.	Influência da temperatura e condições atmosféricas na transformação natural.....	32
4.2.1.2.	Frequências de transformação num grupo de estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i>	33
4.2.2.	Transformação natural em meio líquido	35
4.2.3.	Transformação em sistema bifásico	36
4.3.	Frequência de transformação em função de DNA de diferentes origens.....	36
4.4.	Curva de crescimento das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1 e DQ40A1 Δ <i>cmeB</i>	39
4.5.	Curva de saturação de material genético	41
4.6.	Frequência de transformação de acordo com a fase de crescimento.....	42
4.7.	Cinética de transformação	43
4.8.	Frequência de transformação na presença de DNA competidor	45
4.9.	Coculturas bacterianas	47
	Capítulo 5- Conclusão.....	49
	Capítulo 6- Perspetivas futuras	51
	Referências Bibliográficas.....	53
	Anexos	65
	Anexo 1: Alinhamento do fragmento de 344 pb com o gene da <i>gryA</i> pertencente à estirpe de <i>Arcobacter butzleri</i> AB28/11 (resistente à ciprofloxacina) com o fragmento de <i>Arcobacter butzleri</i> RM4018 (NC_009850.1) (suscetível à ciprofloxacina).....	65
	Anexo 2: Abstract e certificado de participação no XIII annual CICS-UBI Symposium	66

Índice de figuras

Figura 1.1. Mecanismos gerais de transformação em bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo (adaptado de Dubnau (1999)).	10
Figura 1.2. Modelos esquemáticos dos sistemas de secreção de a) bactérias de Gram-positivo, como <i>Bacillus subtilis</i> , b) de Gram-negativo, como <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e c) exemplo do sistema de secreção do tipo IV usado por <i>Helicobacter pylori</i> (adaptado de Claverys & Martin, 2003 e Smeets & Kuster, 2002).	14
Figura 3.1. Representação esquemática dos métodos de transformação em meio sólido. O método A encontra-se a cinzento, o método B encontra-se a azul escuro e a azul claro encontra-se o método C.	21
Figura 4.1. Representação gráfica dos transformantes (UFC)/mL em função do tempo de incubação, utilizando o método C de transformação natural em meio sólido a 37°C e sob condições de microaerofilia. Resultados mostram a média±desvio padrão de três ensaios independentes, realizados para cada período de incubação.	31
Figura 4.2. Frequência de transformação da estirpe <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1 com material genético de diferentes origens, em sistema bifásico em meio BA a 30°C e atmosfera de microaerofilia. Resultados mostram a média±desvio padrão de três ensaios independentes, para cada tipo de material genético.	38
Figura 4.3. Curva de crescimento das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1 e DQ40A1Δ <i>cmeB</i> . Resultados mostram a média±desvio padrão de três ensaios independentes.	40
Figura 4.4. Transformação de <i>Arcobacter butzleri</i> com concentrações crescentes (10- 2000 ng) de gDNA isogénico proveniente da estirpe de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1Δ <i>cmeB</i> . Resultados mostram a média±desvio padrão de três ensaios independentes, para cada concentração de gDNA.	41
Figura 4.5. Transformação em função da fase de crescimento. A curva representa as UFC totais/mL em função do tempo. As colunas representam a frequência de transformação em função do tempo de incubação prévio à adição de gDNA da estirpe de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1Δ <i>cmeB</i> . Resultados mostram a média±desvio padrão para cada tempo de incubação de três ensaios independentes.	43
Figura 4.6. Eletroforese em gel de agarose para confirmação da degradação do DNA no meio de cultura utilizado para transformação. (1) DNA e 100 µg/mL DNase; (2) DNA; (3) DNA em meio de cultura juntamente com 100 µg/mL de DNase e (4) DNA em meio de cultura.	44
Figura 4.7. Cinética de transformação natural. Transformação com gDNA da estirpe de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1Δ <i>cmeB</i> contendo uma cassete de resistência à canamicina. Captura de DNA terminada pela ação da DNase em diferentes períodos de incubação (0-300 minutos) com o material genético. Resultados correspondem a três ensaios independentes.	45
Figura 4.8. Transformação da estirpe de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1 com concentrações crescentes (10-1000 ng) de gDNA da estirpe de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1Δ <i>cmeB</i> na • ausência ou na presença de □ 1 µg de gDNA de <i>Helicobacter pylori</i> ou ♦ 1 µg de gDNA de <i>Campylobacter jejuni</i> . A significância estatística foi determinada usando teste ANOVA, sendo considerada significativa para valores de $p < 0,05$. Os resultados mostram a média±desvio padrão de três ensaios independentes.	46

Figura 4.9. Transferência de determinantes de resistência em coculturas de *A. butzleri* usando as estirpes de *Arcobacter butzleri* 851 (com resistência à ciprofloxacina associada a uma mutação na região QRDR do gene *gyrA*) e DQ40A1 Δ *cmeB* (com uma cassete de resistência à canamicina), ao longo dos períodos de incubação de 0,3,8 e 24 horas. Resultados mostram a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.....48

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Espécies reconhecidas no género <i>Arcobacter</i> por ano e origem do isolado.	1
Tabela 3.1. Identificação e características das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> utilizadas.....	17
Tabela 3.2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para as reações de PCR descritas nos pontos 3.4.2 e 3.4.3	20
Tabela 4.1. Concentração mínima inibitória dos antibióticos ciprofloxacina, canamicina e gentamicina para as diferentes estirpes recetoras de <i>Arcobacter butzleri</i> usadas neste estudo.....	29
Tabela 4.2. Frequência de transformação, em transformantes (UFC)/ (µg DNA x UFC totais), obtida para a estirpe de <i>Arcobacter butzleri</i> DQ40A1 a temperatura e condições atmosféricas variáveis.	33
Tabela 4.3. Frequências de transformação obtidas para as diferentes estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> , transformadas com o gDNA da estirpe AB28/11.....	34

Lista de Abreviaturas

BA	Blood Agar
BHI	Brain Heart infusion
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO _{620nm}	Densidade Ótica a 620nm
FT	Frequência de Transformação
gDNA	DNA genómico
HGT	Transferência Horizontal de Genes (do inglês, <i>Horizontal Gene Transfer</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
QRDR	Região determinante de resistência às quinolonas (QRDR – do inglês <i>Quinolone Resistance Determining Region</i>)
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

Capítulo 1- Introdução

1.1. Género *Arcobacter*

O género *Arcobacter* foi proposto por Vandamme em 1991, como pertencendo à classe *Epsilonproteobacteria* e à família *Campylobacteraceae* (Miller et al., 2007; Stoeva & Ward, 2006). As bactérias pertencentes ao género *Arcobacter* foram inicialmente consideradas como fazendo parte do género *Campylobacter* por serem taxonomicamente próximas deste. As espécies, *Campylobacter cryaerophila* e *Campylobacter nitrofigilis*, sendo atualmente designadas por *Arcobacter cryaerophilus* e *Arcobacter nitrofigilis* foram as primeiras, juntamente com *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter skirrowii*, a constituir o género *Arcobacter* (Vandamme et al., 1992). Nos últimos anos, mais espécies têm sido reconhecidas e incluídas neste género pelas características que apresentam, sendo atualmente constituído por 27 espécies isoladas das mais diversas origens (Tabela 1.1.).

Tabela 1.1. Espécies reconhecidas no género *Arcobacter* por ano e origem do isolado.

Estirpes	Ano	Origem do Isolado	Local	Referência
<i>A. cryaerophilus</i>	1977	Fetos Bovinos	Irlanda do Norte	(Ellis et al., 1978)
<i>A. nitrofigilis</i>	1983	Raízes de <i>Spartina alterniflora</i>	USA	(McClung et al., 1983)
<i>A. butzleri</i>	1991	Amostras de fezes diarreicas	USA	(Kiehlbauch et al., 1991)
<i>A. skirrowii</i>	1992	Fluido prepucial de touros	Bélgica	(Vandamme et al. 1992)
<i>A. cibarius</i>	2005	Carcaças de frangos	Bélgica	(K Houf, On, & Coenye, T Mast, J Van, H Vandamme, 2005)
<i>A. halophilus</i>	2005	Lagoa hipersalina	USA	(Donachie et al. 2005)
<i>A. mytili</i>	2009	Mexilhão e água salobra	Espanha	(Collado et al. 2009)
<i>A. thereius</i>	2009	Porcos e Patos	Bélgica	(Kurt Houf et al., 2009)
<i>A. marinus</i>	2011	Água do mar	Coreia	(Kim, et al., 2010)
<i>A. trophiarum</i>	2011	Porcos de engorda	Bélgica	(De Smet et al. 2011)
<i>A. defluvii</i>	2011	Águas residuais	Espanha	(Collado et al. 2011)
<i>A. molluscorum</i>	2011	Mariscos	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. ellisii</i>	2011	Mexilhões	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. bivalviorum</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levican et al., 2012)
<i>A. venerupis</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levican et al., 2012)
<i>A. anaerophilus</i>	2013	Estuário	India	(Sasi et al., 2013)

Tabela 1.1. Espécies reconhecidas no gênero *Arcobacter* por ano e origem do isolado (continuação).

Estirpes	Ano	Origem do Isolado	Local	Referência
<i>A. cloacae</i>	2013	Esgoto	Espanha	(Levican et al., 2013)
<i>A. suis</i>	2013	Porco	Espanha	(Levican et al., 2013)
<i>A. ebronensis</i>	2014	Mexilhões	Espanha	(Levican et al., 2015)
<i>A. aquimarinus</i>	2014	Água do mar	Espanha	(Levican et al., 2015)
<i>A. lanthieri</i>	2015	Porco e Estrume	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al., 2015)
<i>A. faecis</i>	2016	Águas residuais	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al., 2016)
<i>A. acticola</i>	2016	Água do mar	Coreia do Sul	(Park et al., 2016)
<i>A. pacificus</i>	2016	Água do mar	China	(Zhang et al., 2016)
<i>A. porcinus</i>	2017	Fígado e rim de leitão abortado	Dinamarca	(Figueras et al., 2017)
<i>A. lekithochrous</i> e <i>A. haliotis</i>	2017	Incubadora de moluscos e intestino de abalone (<i>Haliotis gigantea</i>)	Noruega/ Japão	(Diéguez et al., 2017; Tanaka et al., 2017)
<i>A. canalis</i>	2018	Canal de água contaminado com esgoto urbano	Espanha	(Pérez-Cataluña, 2018)

Nota: As espécies *A. lekithochrous* e *A. haliotis*, correspondem à mesma espécie.

Até final do ano de 2013, o gênero *Arcobacter* compreendia 18 espécies (Ferreira et al., 2016), no entanto este número tem vindo a aumentar. Nos dois anos seguintes foi possível o reconhecimento das espécies *A. faecis*, *A. lanthieri*, *A. aquimarinus* e *A. ebronensis* (Levican et al., 2015; Whiteduck-Leveille et al., 2015, 2016). Em 2016 foram identificadas as espécies *A. acticola* e *A. pacificus* isoladas a partir de água do mar (Park et al., 2016; Zhang et al., 2016) e em 2017, a espécie *A. porcinus* foi descoberta de entre um grupo de estirpes previamente identificadas como *A. thereius* (Figueras et al., 2017) e nesse mesmo ano foram ainda reconhecidas as espécies *A. lekithochrous* e *A. haliotis* (Diéguez et al., 2017; Tanaka et al., 2017). No presente ano foi reportada a espécie *A. canalis* (Pérez-Cataluña et al., 2018) e por comparação dos genomas observou-se que *A. lekithochrous* e *A. haliotis* correspondiam a uma mesma espécie (Diéguez et al., 2018).

De entre as espécies que compreendem o gênero *Arcobacter* destacam-se *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, como sendo as espécies mais frequentemente associadas a doenças em humanos e animais (Carbone et al., 2003; Ferreira et al., 2013, 2014; Ho et al., 2006; Houf & Stephan, 2007). *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* têm sido associadas a enterites (Fernández et al., 2004; Figueras et al.,

2014; Lior, Woodward, & International, 1991), bacteriemia (Arguello et al., 2015; Woo et al., 2001; Hsueh et al., 1997) e fezes diarreicas, sendo *A. skirrowii* também associada a esta última condição (Wybo et al., 2004; Lior et al., 1991). Em animais, a sua presença foi igualmente reportada em casos de abortos, mastites e diarreia (Ho et al., 2006; Vandamme et al., 1992). Bactérias destas espécies têm sido isoladas de diversos tipos de amostras, tais como, produtos alimentares destacando-se as carnes, como por exemplo de frango e porco, peixe e vegetais (González & Ferrús, 2011; Vicente-Martins et al., 2018); amostras animais, como fetos de porco abortados; amostras ambientais, como águas de subsolo, mar, fontes e poços; e amostras humanas, tais como fezes diarreicas (Collado & Figueras, 2011; Doudah et al., 2012; Ferreira et al., 2013; Ho et al., 2006; Rice et al., 1999; Maugeri et al., 2004). A sua presença em amostras, como água está geralmente associada a uma elevada contaminação fecal (Collado et al., 2008).

As bactérias do género *Arcobacter* caracterizam-se por serem bacilos de Gram-negativo não esporulados, com 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 3,6 µm de comprimento, a sua forma curvada ou em S está na origem do seu nome (Ferreira et al., 2016). A maioria das espécies do género *Arcobacter* apresenta a capacidade de crescer de forma aeróbia ou em microaerofilia, sendo que a espécie *Arcobacter anaerophilus*, é a única espécie descrita como estritamente anaeróbia (Ferreira et al., 2016). Globalmente, o seu crescimento ocorre num intervalo de temperaturas de 15 a 42°C (Miller et al., 2007), sendo que a sua capacidade de crescimento a baixa temperatura, aliada ao facto de serem capazes de crescimento em aerobiose, são as principais características que as distingue do género *Campylobacter* (Lehner et al., 2005; Snelling et al., 2006). A gama de pH suportada pelas espécies *Arcobacter*, encontra-se entre os 5,5- 8,0, sendo que o crescimento ótimo ocorre no intervalo de 6,0- 7,5 (Cervenka, 2007). *Arcobacter* spp. caracterizam-se por serem oxidase positiva, sendo que em algumas a catalase é inexistente (Ferreira et al., 2016; Vandamme et al., 1991); são dotadas de motilidade, apresentando um único flagelo polar, possuindo também na sua constituição externa outras proteínas, como adesinas e estruturas denominadas pilus (Ferreira et al., 2016; Ho et al., 2008; Miller et al., 2007).

1.2. *Arcobacter butzleri*

Dentro do género *Arcobacter*, destaca-se a espécie *A. butzleri* por ser a mais frequentemente encontrada em diversos tipos de amostra, desde amostras de origem alimentar, tais como carnes (de Boer et al., 1996; Kabeya et al., 2004; Morita et al., 2004; Öngör et al., 2004; Rivas et al., 2004) e vegetais (González et al., 2017), a águas de diversas origens (Diergaardt et al., 2004; Moreno et al., 2003; Rice et al., 1999), bem como amostras de fezes diarreicas (Engberg et al., 2000; Lerner et al., 1994; Vandamme et al., 1992). De facto, *A. butzleri* tem sido considerado o quarto *Campylobacter-like-organism* mais frequentemente encontrado em fezes diarreicas de humanos em diversos países (Collado & Figueras, 2011; Collado et al., 2013; Ferreira et al. 2014; Vandenberg et al., 2004). Devido à sua relevância como agente patogénico, *A. butzleri* foi introduzido na lista de microrganismos considerados um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002). A ampla distribuição de *A. butzleri* em diversos tipos de

ambientes pode ser associada a uma elevada capacidade adaptativa desta bactéria, que por sua vez pode estar relacionada com a elevada diversidade do seu genoma (Atabay & Aydın, 2001; Ferreira et al., 2016; Houf et al., 2003). Com a sequenciação do genoma de *A. butzleri* por Miller e seus colaboradores em 2007, foi possível constatar que o genoma desta bactéria possui 2.341.251 pares de base (pb), sendo considerado o segundo maior identificado na classe Epsilonproteobacteria, e possuindo uma percentagem de G+C relativamente baixa (Miller et al., 2007). Apesar do crescente reconhecimento de *A. butzleri* como agente patogénico e com elevada capacidade de adaptação a vários ambientes, a informação existente acerca desta bactéria é ainda limitada, quando comparada com outros microrganismos da mesma divisão, no entanto o vasto conhecimento existente para outros taxa, permite comparar *A. butzleri* com outros membros (Miller et al., 2007) e assim, ter uma base para estudos futuros.

1.2.1. Relevância clínica e patogenicidade de *Arcobacter butzleri*

Um dos exemplos de agentes patogénicos emergentes de origem alimentar é o género *Arcobacter* (Ho et al., 2006). A espécie *A. butzleri* é a principal responsável, dentro deste género, por problemas tais como enterites, diarreia severa, septicemia e bacteremia (Arguello et al., 2015). Os principais sintomas associados à infeção com esta bactéria são sobretudo, diarreia e dores abdominais, podendo também incluir, vómitos, febre e náuseas (Vandenberg et al., 2004). O seu isolamento em laboratório, foi já realizado a partir de amostras tanto de pacientes sintomáticos como assintomáticos, sendo que neste último a sua ocorrência é inferior. A relação de fatores como a idade ou sistema imunitário com uma maior ou menor manifestação de sintomas causados por esta espécie não está ainda estabelecida (Collado & Figueras, 2011). No entanto, esta bactéria foi encontrada com maior prevalência em pacientes com *diabetes mellitus* (Lerner et al., 1994; Vandenberg et al., 2004) e no grupo pediátrico (Fernández et al., 2004; Ferreira et al. 2014).

A adesão de microrganismos aos tecidos constitui um passo fundamental para que estes possam entrar nas células, ou por outro lado, apenas permanecer à superfície das mesmas, colonizando-as (Klemm et al., 2010). Após a adesão pode dar-se o processo de invasão, levando à multiplicação dos microrganismos no interior das células, sendo capazes de causar a sua morte, tendo como consequência uma resposta inflamatória local (Sansonetti, 1993). Um exemplo é o género *Campylobacter*, em que a sua presença origina uma resposta inflamatória, dando origem a febre, dores abdominais e diarreia (Young et al., 2007). A capacidade de adesão e invasão de agentes patogénicos é um dos principais fatores que contribui para a patogenicidade de diversos microrganismos; estes dois processos desencadeiam uma resposta por parte do sistema imunitário, no entanto quando esta resposta não é eficiente, o agente patogénico consegue proliferar, levando à destruição de tecidos (Cossart & Sansonetti, 2004). A capacidade de adesão é mediada por adesinas, que são proteínas que se encontram na membrana celular das bactérias e promovem a adesão das mesmas a vários tecidos (Klemm & Schembri, 2000). A capacidade de adesão e invasão a células do epitélio intestinal humano foi descrita para *A. butzleri* (Ferreira et al., 2014; Ho et al., 2007; Karadas et al., 2013; Krause-Gruszczynska et al., 2007; Levican et al., 2013). Com a sequenciação do genoma de *A. butzleri* foi

possível a identificação de genes putativos de virulência que apresentavam homologia a genes associados a patogenicidade em outros microrganismos, nomeadamente em *Campylobacter* (Miller et al., 2007). Num estudo realizado por Doudah et al., (2012) foi avaliada a presença de vários genes putativos de virulência em isolados de *A. butzleri*, nomeadamente os genes *ciaB*, *cj1349* e *cadF*, descritos para outras bactérias como responsáveis pela adesão e invasão de células, que apresentavam homologia (57 a 64%) com os genes correspondentes em *Campylobacter* spp. (Doudah et al., 2012). Em *Campylobacter* spp. os genes *cadF* e *cj1349* codificam para proteínas de ligação à fibronectina, proteínas que por sua vez permitem a adesão da bactéria à célula hospedeira, no entanto não se sabe ainda se estes genes putativos de virulência têm função semelhante em *A. butzleri* (Karadas et al., 2013). O gene *ciaB*, codifica para uma proteína de invasão, que possibilita a entrada da bactéria na célula infetada (Karadas et al., 2013). A presença destes genes putativos de virulência foi avaliada em vários estudos, sendo observado que 100% dos isolados analisados, possuíam os genes *cadF*, *cj1349* e *ciaB* (Doudah et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Karadas et al., 2013). De entre 15 espécies de *Arcobacter*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* e *A. defluvii*, foram identificadas como as espécies que demonstram maior capacidade de invasão, tendo sido indicada uma associação entre a capacidade de invasão e a presença do gene *ciaB*, no entanto para os restantes genes não se verificou relação entre a sua presença e capacidade de adesão (Levican et al., 2013), apesar da homologia com genes cujo produto está implicado na adesão em *Campylobacter* spp.

Além da capacidade de adesão e invasão, a citotoxicidade foi já testada em diferentes tipos de linhas celulares (Carbone et al., 2003; Gugliandolo et al., 2008), demonstrando que a maior parte dos isolados, apresenta capacidade de adesão, invasão e provocam citotoxicidade (Collado & Figueras, 2011).

1.2.2. Vias de transmissão de *Arcobacter butzleri*

Os reservatórios mais frequentes de *A. butzleri*, são em geral, águas, animais saudáveis e alimentos; dentro dos géneros alimentícios salientam-se as carnes, nomeadamente as de aves de capoeira (Hsu & Lee, 2015). O incorreto processamento e manuseamento deste tipo de alimentos, pode ter um papel importante na transmissão de *Arcobacter* ao ser humano (Ho et al., 2006; Lehner et al., 2005). A presença de *A. butzleri* foi estudada em equipamentos associados ao abate de animais, onde se pode concluir que a incorreta higienização deste tipo de equipamentos, poderá constituir uma via de contaminação de alimentos por eles processados (Houf et al., 2002). Por outro lado, os vegetais podem também constituir uma via de transmissão desta bactéria, sendo que *A. butzleri* foi já isolado de vegetais, tais como alfaces em Espanha (González & Ferrús, 2011), em locais de processamento de espinafres na Alemanha (Hausdorf et al., 2013), na água do processo de lavagem de cenouras (Hausdorf et al., 2011), bem como em legumes embalados prontos a comer em Portugal (Vicente-Martins et al., 2018). A presença desta bactéria em géneros alimentícios, nomeadamente prontos a consumir, apontam para um perigo para a saúde do consumidor (Lappi et al., 2013).

A ingestão de água contaminada, é também considerada como uma das principais vias de transmissão de *A. butzleri*, tendo sido relatados surtos associados ao consumo de águas de poços contaminadas

nos Estados Unidos da América em 1999 (Rice et al., 1999). Mais tarde, outro caso ocorreu em Ohio, onde os poços, com água supostamente potável, apresentavam contaminação fecal. De entre as espécies isoladas encontravam-se microrganismos do género *Arcobacter*, não tendo no entanto sido possível a identificação ao nível da espécie (Fong et al., 2007). Para além disso *A. butzleri* pode ser encontrado em águas de diversas fontes, como águas de subsolo (Rice et al., 1999), água do mar (Maugeri et al., 2004) e rios (Diergaardt et al., 2004). Apesar da ingestão de águas e alimentos contaminados, serem apontados como as principais vias de transmissão (Stoeva & Ward, 2006), até ao momento, ainda não foi estabelecida uma relação direta com a doença em humanos nem a dose infetante para este microrganismo (Collado & Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016).

Também a transmissão pessoa-a-pessoa, foi anteriormente proposta como possível via de transmissão, devido a um surto com sintomas de dores abdominais ocorrido numa escola em Itália, onde foram recolhidas estirpes de diversos doentes com genótipos e fenótipos comuns (Vandamme et al., 1992). Outro caso de estudo indicativo deste tipo de transmissão foi o caso de um recém-nascido de onde foi isolada uma estirpe de *A. butzleri* resistente a múltiplos antibióticos, em que se considerou que tenha ocorrido transmissão pré-natal *in utero* (On, Stacey, & Smyth, 1995).

O contacto com animais domésticos, como cães e gatos, é também apontada como uma possível via de transmissão, sendo que esta bactéria foi também encontrada, em amostras de saliva destes animais, num estudo realizado por Fera em 2009, levantando-se assim a possibilidade deste contacto contribuir como via de transmissão (Fera et al., 2009).

1.2.3. Resistência de *Arcobacter butzleri* a compostos antibacterianos

A descoberta de compostos antibacterianos, tais como antibióticos, permitiu melhorar e aumentar a qualidade de vida do ser humano, possibilitando o tratamento de diversas infeções bacterianas (Van Hoek et al., 2011). Em função do seu mecanismo de ação nos sistemas biológicos, é possível hoje em dia classificar os antibióticos em diferentes classes (Neu, 1992). Assim os antibacterianos podem danificar ou inibir a síntese da parede celular, inibir a síntese de proteínas ou a replicação do DNA e RNA (Neu, 1992; Van Hoek et al., 2011). No entanto, o uso excessivo de antibióticos em diversos contextos, como médico, veterinário ou mesmo alimentar (Ünver et al., 2013) tem sido relacionado com o desenvolvimento acentuado de resistências em espécies bacterianas (Van Hoek et al., 2011). Atualmente a resistência aos antimicrobianos é cada vez mais um problema de saúde pública. A dificuldade no tratamento de infeções bacterianas surge principalmente devido ao aumento do número de bactérias multirresistentes. (Frieri et al., 2017; Littmann et al., 2015). A aquisição de resistências é um processo natural, que pode ocorrer por aquisição e incorporação de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposões e integrões (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; MacGowan & Macnaughton, 2017). Este processo, em alguns casos deve-se a uma troca genética entre espécies bacterianas, podendo ocorrer através de processos, como a conjugação, a transdução e a transformação (Chen & Dubnau, 2004).

Desde a descoberta do género *Arcobacter*, tem sido relatado em vários trabalhos o isolamento de estirpes bacterianas com resistência a diversas classes de antibióticos como os β -lactâmicos, fenicóis, macrólidos e fluoroquinolonas entre outros (Atabay & Aydin, 2001; Ferreira et al., 2013; Kabeya et al., 2004; Otth, et al., 2004). No caso de *A. butzleri*, Miller et al. (2007) verificaram que este microrganismo era resistente a 42 dos 65 antibióticos estudados, sendo resistente a todos os macrólidos, sulfonamidas e a quase todos os β -lactâmicos testados. *A. butzleri* mostrou possuir um vasto leque de resistências a antibióticos quando comparado com outras bactérias taxonomicamente próximas, como é o caso de *Campylobacter coli*, sendo esta apenas resistente a 33 dos 65 antibióticos testados nesse mesmo estudo (Miller et al., 2007). A resistência a múltiplos antibióticos tem sido de facto descrita para *A. butzleri* por diversos autores (Ferreira et al., 2013, 2017; Houf et al., 2004; Kabeya et al., 2004; Son et al., 2007; Vicente-Martins et al., 2018). Sabe-se assim que *A. butzleri* apresenta resistência a diversas classes de antibióticos, de entre os quais, a resistência à eritromicina e à ciprofloxacina, que são das mais preocupantes, uma vez que, estes são os antibióticos indicados como terapêutica de primeira linha para o tratamento de infeções severas por *Arcobacter* (Houf et al., 2004). As fluoroquinolonas, permitem combater diversas infeções bacterianas, no entanto estas aplicações e a elevada utilização nas mesmas, leva a uma acumulação no meio ambiente e pode ter como consequência o aparecimento de bactérias resistentes a estes antibióticos (Redgrave et al., 2014; Silva et al., 2011). O surgimento de estirpes de *A. butzleri* resistentes à ciprofloxacina por possível exposição de a este antibiótico foi já sugerido em trabalhos anteriores. De facto, elevadas taxas de resistência à ciprofloxacina têm sido reportadas em países como Portugal (Ferreira et al., 2013), Itália e Turquia (Atabay & Aydin, 2001; Fera et al., 2003). Em *A. butzleri* o mecanismo de resistência a este antibiótico foi identificado como correspondendo a uma mutação pontual no gene codificante da subunidade A da enzima DNA girase na posição 254 pertencente à “região determinante de resistência às quinolonas” (QRDR – do inglês *Quinolone Resistance Determining Region*), em que uma citosina é alterada para uma timina, levando à transição do aminoácido treonina para isoleucina, tendo como consequência um aumento da resistência às fluoroquinolonas (Abdelbaqi et al., 2007; Ferreira et al., 2016; Van Hoek et al., 2011). A resistência aos macrólidos pode estar associada a mutações em proteínas ribossomais, que originam um aumento da resistência a este grupo de antibióticos (Fera et al., 2003), no entanto o seu mecanismo de resistência ainda não está esclarecido.

1.3. Transferência Horizontal de genes

A transferência horizontal de genes (HGT – do inglês *Horizontal Gene Transfer*) caracteriza-se pela transferência de genes entre microrganismos, para outros que não sejam da sua descendência (Thomas & Nielsen, 2005). A troca de material genético é possível quando ocorre a morte celular, ou quando células vivas o libertam controladamente no meio (Thomas & Nielsen, 2005). A HGT é o processo pelo qual a maior parte das bactérias adquirem genes, de outras espécies, tendo-se demonstrado que a maior parte dos genes que conferem patogenicidade encontrados em bactérias, são adquiridos por este mecanismo (Nakamura et al., 2004). Por vezes os mesmos genes que conferem patogenicidade podem ser transportados por organismos com uma relação menos próxima

evolutivamente (Thomas & Nielsen, 2005). Os genes adquiridos pela célula recetora podem ter diferentes efeitos no genoma, dependendo da característica herdada, estes podem permanecer no organismo e espalhar-se por gerações, ou ser deletados, por aquisição de um novo mais vantajoso, ou ainda podem ter um efeito neutro, que dependendo das condições onde o microrganismo se encontra, pode levar ou não a uma expressão do gene (Thomas & Nielsen, 2005). Quando a característica é vantajosa, esta tende a espalhar-se rapidamente pelas gerações seguintes, um exemplo destas são os fatores implicados na resistência a antibióticos ou na produção de toxinas (Blokesch, 2016; Thomas & Nielsen, 2005; Wilson et al., 2003).

Apesar de HGT ser um processo relevante para o aumento da diversidade genética em bactérias, existem inúmeras barreiras que dificultam a transferência de genes entre elas. No caso da transformação por HGT, é sobretudo a célula recetora que desempenha um papel fundamental, sendo que ela própria pode constituir uma barreira à entrada do novo DNA (Thomas & Nielsen, 2005), por não se encontrar no estado de competência, ou a superfície membrana rejeitar o DNA. Outra barreira a HGT, é a existência de enzimas de restrição, que podem degradar a cadeia de DNA por não a reconhecerem como fazendo parte do genoma (Thomas & Nielsen, 2005). Além destes fatores, o tempo que o DNA exogénico permanece no meio, sem ser incorporado, pode levar à sua degradação, em função das condições do meio onde se encontra (Nielsen et al., 2007).

Existem diversos processos que contribuem para a HGT, nomeadamente a conjugação, a transdução e a transformação natural, que possibilitam a transferência de características entre microrganismos (Normark & Normark, 2002). Este último tipo de mecanismo permite por exemplo a transferência de genes putativos de virulência, ou mesmo de marcas de resistência entre espécies ou estirpes bacterianas, gerando um aumento da variabilidade genética (Domingues et al., 2012). No entanto o processo de transformação natural é possivelmente dentro destes o que melhor esclarece acerca de como as bactérias adquirem material genético de outras espécies (Thomas & Nielsen, 2005).

1.4. Transformação natural

As bactérias evoluíram de maneira a adaptarem-se a condições adversas do meio ambiente, sendo capazes de captar e incorporar material genético libertado, quer por outras bactérias, quer por decomposição de partículas virais, através de diversos mecanismos (Thomas & Nielsen, 2005). A transformação natural é o processo pelo qual, os microrganismos são capazes de captar DNA livre no meio (Lorenz & Wackernagel, 1994). Este processo é possível sem que haja intervenção de fatores externos, como a permeabilização artificial das células, por exemplo por aplicação de um campo magnético, como é o caso da eletroporação (Dubnau, 1999). A transformação natural caracteriza-se pela absorção, incorporação e expressão funcional do DNA extracelular, podendo ocorrer em condições normais de crescimento bacteriano (Thomas & Nielsen, 2005). Atualmente são reconhecidas mais de 80 espécies naturalmente transformáveis (Blokesch, 2016), onde o processo de transformação natural poderá potencialmente explicar de que modo as células bacterianas conseguem adquirir material genético de outras espécies (Thomas & Nielsen, 2005).

Muitos microrganismos incorporam material genético, quer por morte de outras células, quer por existência de células dadoras. Bactérias de estirpes ou espécies diferentes tem a capacidade de incorporar material genético de outras, por HGT. Organismos distantes evolutivamente, ou mesmo de estirpes diferentes, podem trocar genes através da HGT (Gogarten et al., 2002), no entanto, para que tal aconteça é necessário que se desenvolva um estado, denominado estado de competência (Chen et al., 2005; Thomas & Nielsen, 2005). Pensa-se que o estado de competência será um estado temporário na maior parte das espécies (Chen & Dubnau, 2004), sendo controlado por sinais como *quorum sensing* ou de nutrientes (Claverys & Håvarstein, 2002; Hamoen et al., 2003; Macfadyen et al., 2001). O desenvolvimento de competência, para algumas bactérias, como por exemplo *Haemophilus influenzae*, é desencadeado quando os nutrientes escasseiam, já para *Streptococcus pneumoniae*, a competência é inibida, quando o mesmo acontece (Solomon & Grossman, 1996). Após o desenvolvimento deste estado é necessário que exista, uma célula dadora que fornece o DNA à célula recetora, responsável pela ligação e absorção do mesmo. Este processo permite-lhes adquirir características favoráveis, aumentando a sua capacidade adaptativa, bem como garantindo a sua sobrevivência em condições adversas, e como consequência aumentando a sua diversidade genética (Hua et al., 1998).

Os mecanismos específicos envolvidos no processo de transformação foram estudados em poucas espécies (Vegge et al., 2012), sabendo-se apenas que existem dois mecanismos globais, que diferem em função de se tratar de espécies de bactérias de Gram-negativo ou de Gram-positivo (Wang & Taylor, 1990), os quais estão representados na figura 1.1. Inicialmente, para que ocorra transformação é necessário que ocorra a captura de DNA, sendo fundamental que este passe de um estado de DNA sensível à DNase, para um estado de DNA protegido de DNase. Em bactérias de Gram-negativo o estado de DNA protegido da DNase é alcançado, quando a cadeia de DNA atravessa a membrana externa, já para bactérias de Gram-positivo o mesmo estado é alcançado quando ocorre a passagem do DNA para o citosol (Chen & Dubnau, 2004; Chen & Gotschlich, 2001; Dubnau & Chen, 2003). No caso destas, o DNA liga à superfície da célula e uma das cadeias é degradada, sendo os nucleótidos libertados no meio extracelular, ao passo que a outra cadeia entra na célula (Chen & Dubnau, 2004). No caso de bactérias de Gram-negativo este processo torna-se mais difícil, pela existência da membrana externa, que constitui uma barreira adicional (Dubnau, 1999), pois só após atravessar a membrana externa é que o DNA pode ser convertido do estado sensível para o protegido, sendo então uma das cadeias degradada e os nucleótidos libertados no periplasma, ao passo que a outra entra no citoplasma, concluindo-se o processo de captura (Chen & Dubnau, 2004). Em ambos os casos, pensa-se que sejam ativadas um conjunto de proteínas, responsáveis por este processo, sendo inicialmente necessário que as bactérias desenvolvam o estado de competência (Chen et al., 2005; Dubnau, 2003; Hahn, 2015; Johnsborg et al, 2007).

Após a passagem do DNA para o citoplasma, este pode por homologia substituir parte do DNA da célula recetora (Thomas & Nielsen, 2005), no entanto no processo de transformação existe também a possibilidade de ocorrer o processo de recombinação não homóloga, que se caracteriza pela recombinação de sequências com pouca ou nenhuma homologia (de Vries & Wackernagel, 2002; Ehrlich et al., 1993; Thomas & Nielsen, 2005). No processo de integração da molécula de DNA, pode também ocorrer uma incorporação de material genético extra (Dempsey & Dubnau, 1989). A inserção

deste material, a partir da molécula dadora, ocorre quando existe uma elevada similaridade entre sequências curtas de ambas as moléculas, estas podem dar-se por exemplo entre plasmídeos e o DNA bacteriano, levando à fusão do plasmídeo com o DNA da bactéria (Thomas & Nielsen, 2005).

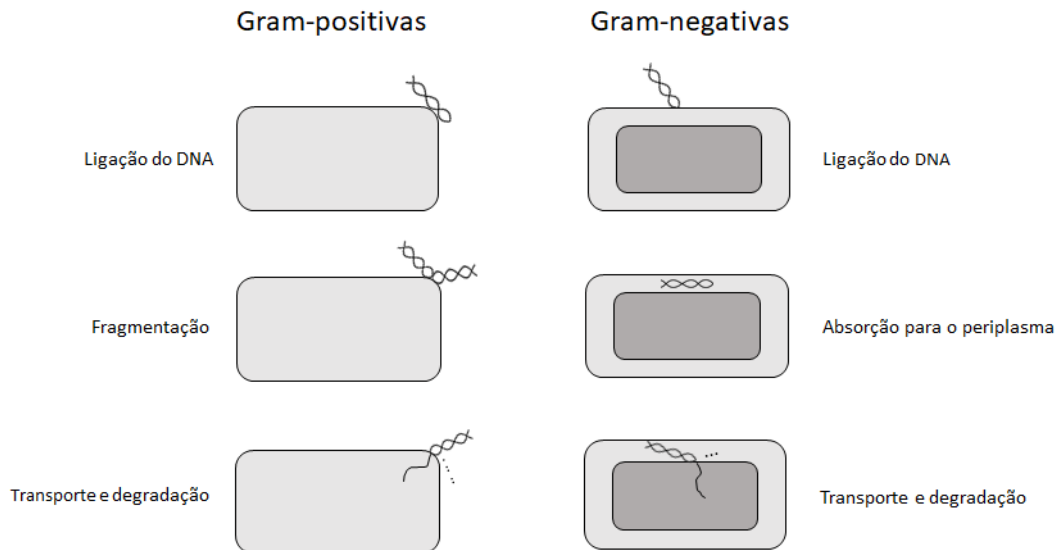


Figura 1.1. Mecanismos gerais de transformação em bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo (adaptado de Dubnau (1999)).

1.4.1. Desenvolvimento de competência bacteriana

Para que ocorra o processo de transformação é então necessário que as bactérias se encontrem num estado de competência. Bactérias que desenvolvem competência ou que são naturalmente competentes, são capazes de capturar e integrar com facilidade DNA do meio (Shah et al., 2014), possibilitando-lhes alcançar características de outros microrganismos (Hofreuter et al., 1998). O desenvolvimento de competência dá-se sobretudo na fase exponencial de crescimento para algumas bactérias, ao passo que outras, são competentes num espaço de tempo muito reduzido, podendo desenvolver competência no início da fase estacionária (Johnsborg et al., 2007). Por outro lado, existem bactérias em que a competência é apenas desenvolvida se houver um estímulo ambiental, como é o caso de *Bacillus subtilis* em que, uma elevada densidade bacteriana provoca a indução da competência, no entanto, apenas num reduzido número de células da população bacteriana (Blokesch, 2016). Atualmente, pensa-se que a maior parte das espécies bacterianas sejam competentes (Claverys & Martin, 2003). Apesar de ser considerado um estado transiente nos microrganismos, o mesmo pode ser desencadeado por diversos fatores (Chen & Dubnau, 2004). Para a maior parte das espécies estes fatores não são conhecidos, no entanto estes são capazes de ativar um conjunto de proteínas responsáveis por ligar, fragmentar, degradar e transportar o DNA (Chen et al., 2005; Dubnau, 1999). Através de canais formados por estas proteínas de competência o DNA consegue atravessar a parede celular de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo, chegando por fim ao citosol (Chen et al., 2005).

Apesar de existirem bactérias que sintetizam as suas proteínas de competência de maneira constitutiva, como é o caso de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* (Johnsborg et al., 2007), a competência na maior parte das bactérias é regulada por genes *com* (Claverys & Martin, 2003), que são expressos em função de sinais ambientais. As proteínas de competência fazem parte de um sistema importante para a captura e transporte de DNA através da membrana. Normalmente, a maquinaria usada baseia-se num sistema do tipo IV *pili* ou *pseudopilus*, sendo usado pela maior parte das bactérias competentes (Johnsborg et al., 2007). A exceção encontra-se em *Helicobacter pylori*, em que o transporte do DNA através da membrana plasmática é baseada em componentes do sistema de secreção do tipo IV, diferentes dos usados por outros microrganismos de Gram-negativo (Hofreuter et al., 2001). Este sistema permite a troca de DNA através de um canal formado por um conjunto de subunidades proteicas que se projetam desde o interior da bactéria até à superfície (Johnsborg et al., 2007).

1.4.2. Captura de DNA exogénico

Para que ocorra a captura de DNA exogénico, é necessário que estejam envolvidos dois processos, que se caracterizam pela ligação do DNA a locais específicos localizados na superfície da membrana, seguida do transporte ou absorção do mesmo ao longo da membrana até ao citoplasma (Thomas & Nielsen, 2005). Esta captura de DNA é realizada através de canais específicos, formados por um conjunto de proteína específicas (Chen et al., 2005), neste processo o DNA em cadeia dupla é transformado em DNA em cadeia simples, à medida que atravessa do exterior da célula bacteriana para o citosol (Thomas & Nielsen, 2005).

Como foi referido anteriormente, para que o DNA seja capturado pelos microrganismos, é necessário um sistema que permita a sua transferência desde o meio onde se encontra até ao citosol. As células bacterianas dispõem de um conjunto de pilosidades, que são normalmente responsáveis pelo contacto entre células, motilidade, adesão, secreção e absorção de compostos (Holden & Gally, 2004). Inicialmente os sistemas de *pilus* foram divididos por Ottow em 1975 em diferentes tipos. Do tipo I, fazem parte um sistema responsável pela libertação de proteínas, este é constituído por uma proteína de cassete de ligação ao ATP (ABC), que permite a transferência de diversos substratos, através da membrana (Binet et al., 1997). Este grupo é ainda constituído por uma proteína de fusão de membrana, ambas se encontram na membrana interna, na membrana externa existe ainda uma proteína que permite a formação de um poro na célula (Binet et al., 1997). O tipo II de secreção, permite a secreção de algumas proteínas, para o espaço periplasmático (Koster et al., 2000). O tipo III relaciona-se com um sistema de libertação de fatores de virulência, dentro das células hospedeiras (Koster et al., 2000). O grupo IV encontra-se associado à conjugação (Koster et al., 2000; Saier, 2006). Este último grupo é constituído por um conjunto de subcomplexos que pertencem à parede celular bacteriana (Georgiadou et al., 2012; Leighton et al., 2015), podendo ser encontradas estruturas análogas em diferentes espécies bacterianas (Georgiadou et al., 2012). Atualmente sabe-se que tanto bactérias de Gram-negativo como de Gram-positivo dispõem de um conjunto de elementos, com semelhança a proteínas existentes no sistema de secreção do tipo II e ao tipo IV *pili* (Chen & Dubnau, 2004; Dubnau & Chen,

2003). Estes sistemas permitem o transporte de material genético e proteínas através do contacto entre células bacterianas (Thomas & Nielsen, 2005), possibilitando como consequência a transferência de genes entre diferentes espécies bacterianas.

1.4.2.1. Ligação do DNA

Algumas bactérias de Gram-negativo como *Haemophilus influenzae* ou *N. gonorrhoeae*, por exemplo, necessitam que o DNA que se destina à incorporação, contenha uma sequência específica, a chamada sequência de captura sinal (USS) ou sequência de captura de DNA (DUS), um *motif* de sequência curta, o qual é constituído por um reduzido número de pares de base (Danner et al., 1980; Elkins et al., 1991; Fitzmaurice et al., 1984). Para *N. gonorrhoeae* a sequência contém 12 pb e para *H. influenzae* 9-10 pb (Johnsborg et al., 2007), onde apenas o DNA contendo a mesma, tem a possibilidade de ligar e atravessar a membrana (Chen & Dubnau, 2004). Para outros microrganismos, parece não haver a necessidade da existência de uma sequência específica para que ocorra a ligação do DNA à superfície da célula, como é o caso de *S. pneumoniae* (Dubnau, 1999) e *B. subtilis* (Chung & Dubnau, 1998). No entanto, tanto em bactérias de Gram-negativo como de Gram-positivo, ocorre sempre a ligação do DNA exógeno à membrana, para posterior absorção, independentemente da existência, ou não de uma sequência específica (Dubnau, 1999; Thomas & Nielsen, 2005), desde que esta se encontre em estado de competência.

1.4.2.2. Absorção e processamento do DNA

Considerando organismos modelo, verifica-se que em bactérias de Gram-positivo, como é o caso de *B. subtilis*, os canais que permitem a passagem de DNA, são constituídos por um conjunto de proteínas ComG que permitem a ligação do DNA (Chung & Dubnau, 1998). Neste microrganismo foi detetado um complexo polimérico que se projeta desde o interior da membrana até ao exterior, atravessando a parede celular. A estrutura constituída por unidades de ComGC ligadas entre si, foi chamada de estrutura de competência ψ - pilus, a qual pode contribuir para a captura de DNA, deslocando-o até à proteína de ligação ComEA, sendo que esta o transfere para uma nuclease, que procede à degradação de uma das cadeias de DNA (Chen et al., 2005). Em paralelo, a cadeia complementar é deslocada através de um canal formado por proteínas ComEC, até à proteína ComFA que a encaminha para o citosol (Chen et al., 2005; Chen & Dubnau, 2004; Claverys & Martin, 2003; Draskovic & Dubnau, 2004; Inamine & Dubnau, 1995).

No caso de bactérias de Gram-negativo, como *N. gonorrhoea*, apesar da existência da membrana externa, funcionando como barreira adicional à absorção do DNA, este tipo de bactérias tem um mecanismo semelhante ao usado pelas de Gram-positivo, de modo a deslocarem o DNA exógeno, para o citoplasma. Neste caso, o DNA liga-se à membrana externa após ser reconhecido por um recetor de sequência sinal, desencadeando a abertura de um canal formado pela secretina PilQ (Chen & Dubnau, 2004; Claverys & Martin, 2003; Dubnau & Chen, 2003). À semelhança do que acontece em *B. subtilis*, *N. gonorrhoea* possui na sua constituição uma proteína de ligação ao DNA, a ComE, um ortólogo da

proteína ComEA em *B. subtilis* (Dubnau & Chen, 2003), esta permite a passagem do DNA através do periplasma e da camada de peptidoglicano (Chen & Gotschlich, 2001), chegando por fim à nuclease, que degrada uma das cadeias, enquanto que a outra percorre um canal de proteínas ComA, até ao citoplasma (Chen & Dubnau, 2004).

No caso de *H. pylori* o sistema de absorção de DNA usado é distinto do utilizado pelas restantes bactérias de Gram-negativo, sendo constituído por elementos semelhantes aos presentes num sistema de secreção do tipo IV (Hofreuter et al., 2001; Johnsborg et al., 2007), o qual é responsável pelo transporte de DNA e de proteínas através da membrana, sendo codificado pelo operão *comB*, constituído por quatro genes putativos de competência (Hofreuter et al., 2001, 1998). Este tipo de sistema pode também estar presente em *Campylobacter*, sendo que foram encontrados genes ortólogos que codificam para este tipo de sistemas neste microrganismo (Bacon et al., 2000). A captura de DNA em *H. pylori*, ocorre através de um conjunto de proteínas, que formam um canal que atravessa as membranas e o espaço periplasmático. Este canal é formado pelas proteínas, ComB7, ComB8, ComB9 e ComB10, sendo todas, à exceção da ComB7, essenciais para o processo de transformação, no entanto esta última poderá ter a capacidade de estabilizar o complexo formado pelo conjunto de proteínas (Chen & Dubnau, 2004). Todos estes sistemas encontram-se representados na figura 1.2.

Os mecanismos referidos, parecem estar conservados em diversos microrganismos competentes, sendo um processo importante para o aumento da sua diversidade genética (Dubnau & Provvedi, 2000). Até ao momento não se sabe muito acerca da transformação natural de *A. butzleri*, nem sobre quais os mecanismos de transformação que possam estar associados. Na análise do genoma de *A. butzleri* foram identificados genes putativos de competência natural, no entanto o seu papel não está estudado. A transformação natural desta bactéria estará provavelmente associada a um dos mecanismos referidos, ou semelhantes, que permitirá promover a sua diversidade.

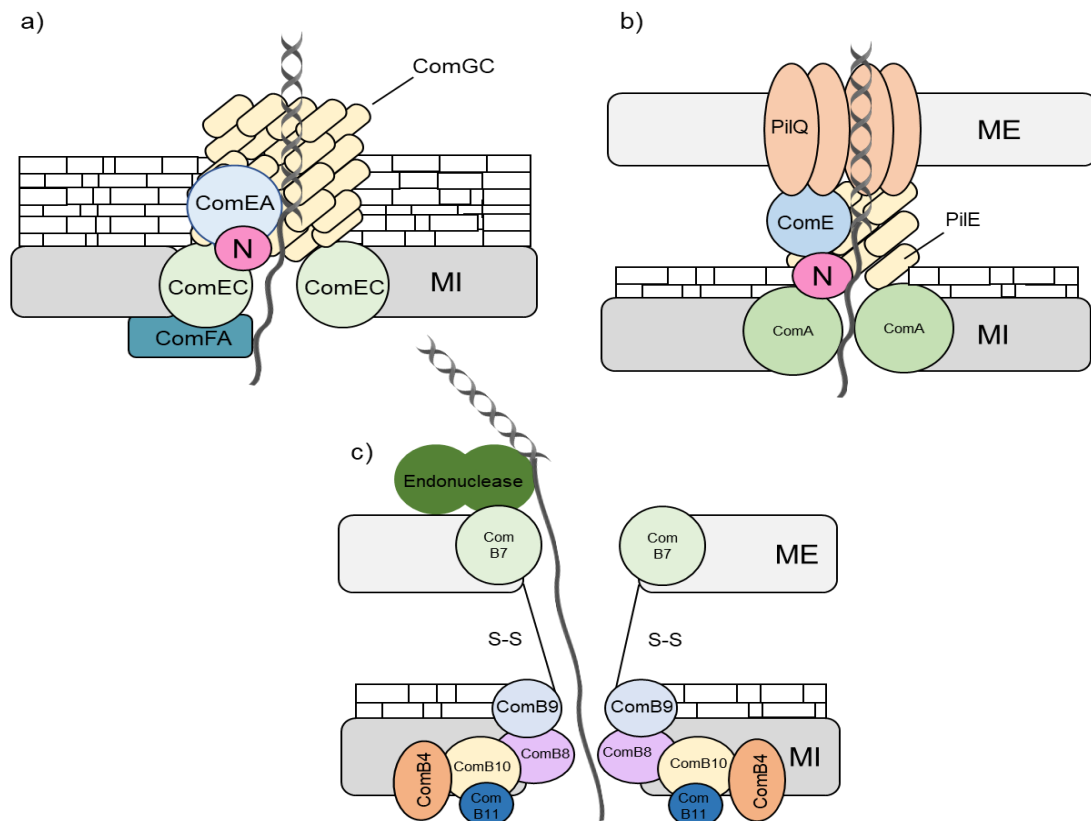


Figura 1.2. Modelos esquemáticos dos sistemas de secreção de a) bactérias de Gram-positivo, como *Bacillus subtilis*, b) de Gram-negativo, como *Neisseria gonorrhoeae* e c) exemplo do sistema de secreção do tipo IV usado por *Helicobacter pylori* (adaptado de Claverys & Martin, 2003 e Smeets & Kuster, 2002).

1.4.3. Integração do DNA no cromossoma

Após a entrada de DNA na célula, caso haja homologia a cadeia é incorporada no genoma bacteriano. Esta incorporação, depende do nível de similaridade entre a cadeia de DNA exógeno e a cadeia de DNA do genoma bacteriano da célula recetora. Este mecanismo tem como consequência a deleção de genes que se encontrem na fração de DNA que é substituído, contudo preservando o tamanho da área recombinada (Thomas & Nielsen, 2005). Quando o material genético incorporado é pouco ou nada semelhante ao do hospedeiro, pode dar-se o processo de recombinação ilegítima, não dependendo este processo de seqüências específicas e sendo este processo pouco frequente (Blokesch, 2016; Thomas & Nielsen, 2005). Em qualquer um dos casos se a característica adquirida, constituir uma vantagem à sua sobrevivência, é então transmitida às células filhas. Este mecanismo permite ao microrganismo, juntamente com alterações genómicas, como mutações, evoluir adaptando-se a novas condições ambientais (Dobrindt et al., 2004).

Assim, o processo de transformação natural bem como os mecanismos a ele associados poderão contribuir para o estudo genético em *A. butzleri*, assim como também esclarecer acerca da diversidade genética desta bactéria.

Capítulo 2- Objetivos

A. butzleri tem sido referido como uma bactéria patogénica emergente, que apresenta uma ampla distribuição em diversos ambientes podendo esta estar associada a uma elevada capacidade adaptativa, e por sua vez à sua elevada diversidade genética. Um dos mecanismos que poderá estar associado a esta heterogeneidade genética é a HGT, através do processo de transformação natural. Assim, este trabalho teve como objetivo geral, caracterizar e aumentar o conhecimento acerca do processo de transformação natural em *A. butzleri*.

Para tal definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a frequência de transformação natural em *A. butzleri* utilizando protocolos descritos para outras bactérias da mesma família bem como de famílias próximas;
- Analisar a competência natural em função de condições ambientais, estudando a influência da temperatura e das condições atmosféricas neste processo;
- Investigar de que modo o tipo e concentração de material genético adicionado influencia a frequência de transformação;
- Avaliar o impacto da fase de crescimento, bem como da competição com outros materiais genéticos na frequência de transformação;
- Estudar a troca de material genético em coculturas bacterianas, nomeadamente na captura de DNA exogénico, considerando *A. butzleri* como dador ou recetor de DNA.

Capítulo 3 - Material e métodos

3.1. Estirpes de *Arcobacter butzleri*

Ao longo do trabalho de investigação foram utilizadas diferentes estirpes de *A. butzleri* para a avaliação da capacidade de transformação natural por esta bactéria. As estirpes utilizadas, bem como a origem das mesmas encontram-se apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Identificação e características das estirpes de *Arcobacter butzleri* utilizadas.

Estirpe	Origem	Referência bibliográfica
AB22/11	Superfície de um matadouro	Ferreira et al., 2013
AB28/11	Pele de pescoço da carcaça de frango	Ferreira et al. 2013
AB45/11	Escorrimento de carcaça de frango	Ferreira et al., 2013
DQ40A1	Superfície de um equipamento de uma queijaria	Ferreira et al., 2017
DQ40A1 Δ cmeB	Indução laboratorial de resistência por inserção de uma cassette de resistência à canamicina interrompendo o gene <i>cmeB</i> da estirpe nativa <i>A. butzleri</i> DQ40A1	Silva, 2017
CR113-2	Vegetais prontos para consumo	Vicente-Martins et al., 2018
CR113-2 Δ cmeB	Indução laboratorial de resistência por inserção de uma cassette de resistência à canamicina interrompendo o gene <i>cmeB</i> da estirpe nativa <i>A. butzleri</i> CR113-2	Silva, 2017
2003/1426	Paciente com diarreia	Ferreira et al., 2014
851	Indução laboratorial de resistência por inserção de uma mutação pontual no gene <i>gyrA</i> na posição 254 na estirpe nativa <i>A. butzleri</i> DQ40A1	Este estudo

3.2. Armazenamento e condições de crescimento das estirpes

As estirpes utilizadas foram conservadas a longo prazo a -80°C em tubos criogénicos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) com 20% (v/v) glicerol. Antes de cada ensaio, as estirpes de *A. butzleri* foram repicadas em placas de Blood agar base (Oxoid, Estados Unidos da América) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo (v/v) (BA- Blood Agar), ou Tryptic Soy Agar (TSA, Merck Millipore, Alemanha), em função do objetivo de utilização. Quando necessário estas foram transferidas para meio, TSA ou BA, contendo 4 $\mu\text{g/mL}$ de ciprofloxacina ou 30 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina, ou ambos antibióticos.

3.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

De modo a avaliar a suscetibilidade das estirpes de *A. butzleri* aos compostos antibacterianos a utilizar neste trabalho, nomeadamente à canamicina e à ciprofloxacina procedeu-se à determinação da concentração mínima inibitória destes antibióticos para as estirpes de *A. butzleri* AB22/11, AB45/11, CR113-2, DQ40A1, 2003/1426, DQ40A1 Δ *cmeB* e 851, através da metodologia de microdiluição como descrito por Ferreira et al., 2018, com modificações. Para a estirpe DQ40A1 foi ainda determinada a CMI da gentamicina.

Inicialmente as estirpes a utilizar foram inoculadas em placas de TSA, as quais foram incubadas a 30°C durante 24 horas numa jarra sob condições de microaerofilia (6% O₂, \pm 7,1% CO₂ e 3,6% H₂) geradas através de um modificador de atmosfera (Anoxomat AN2CTS, Mart Microbiology B.V., Holanda). Numa placa de 96 poços, procederam-se a diluições sucessivas de 1:2 de cada antibiótico em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB, Merck Millipore, Alemanha) num volume final de 50 μ L. De seguida, ajustou-se a suspensão celular a uma turbidez de aproximadamente 0,5 McFarland, por suspensão direta das colónias numa solução salina de NaCl a 0,85% (p/v). Posteriormente, o inóculo foi diluído em meio TSB de forma a obter uma concentração celular por poço de cerca de 5×10^5 unidades formadoras de colónias (UFC)/mL, e 50 μ L desta suspensão foram adicionados aos poços da placa. Em todos os ensaios foi incluído um controlo de crescimento (50 μ L de meio com 50 μ L de suspensão celular) e um controlo de esterilidade (100 μ L de meio). De seguida, as placas foram incubadas sob condições de microaerofilia a 30°C durante 48 horas. A CMI foi definida como a menor concentração de antibiótico que inibiu o crescimento a olho nú, sendo que a turbidez dos poços foi confirmada posteriormente por avaliação da densidade ótica a 620 nm (DO_{620nm}) num leitor de microplacas, tendo-se considerado ausência de crescimento para DO_{620nm} \leq 0,05.

3.4. Obtenção de material genético a usar na transformação natural

Com o objetivo de avaliar de que modo a dimensão e o tipo de material genético influência a frequência de transformação, foram usados nos ensaios realizados: DNA genómico (gDNA) das estirpes de *A. butzleri* AB28/11, DQ40A1 Δ *cmeB* e CR113-2 Δ *cmeB*, para além de fragmentos resultantes da reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*) de tamanhos distintos de várias estirpes de *A. butzleri*. Para ensaios utilizando material genético de outras espécies foi usado gDNA das estirpes *H. pylori* ATCC26695, *Campylobacter coli* 873 (Duarte et al., 2014) e *Campylobacter jejuni* NCTC11168.

3.4.1. Extração de DNA genómico

Para a extração de gDNA recorreu-se ao uso do kit GF-1 Nucleic Acid Extraction kit (Vivantis, Malásia). Assim a estirpes de *A. butzleri* AB28/11, DQ40A1 Δ *cmeB* e CR113-2 Δ *cmeB* foram primeiramente inoculadas em placas de BA, sendo incubadas a 30°C durante 48 horas. Já as estirpes de *C. coli*, *C. jejuni* e *H. pylori*, foram inoculadas em placas de BA, sendo posteriormente incubadas a 37°C sob

condições de microaerofilia, durante 48 horas. Seguidamente as células foram suspensas em água ultrapura estéril, tendo-se posteriormente procedido de acordo com o protocolo do manual de utilização do kit referido. O material genético obtido foi posteriormente quantificado num nanoespectrofotómetro (NanoPhotometer, IMPLEN, Alemanha) e a sua integridade e pureza analisada por eletroforese em gel de agarose de 1% (p/v) em tampão TAE 1x e corado com Midori Green (NIPPON Genetis, Alemanha), sendo sempre aplicado um marcador de peso molecular GRS Universal Ladder (GTiSP, Portugal). A corrida eletroforética decorreu durante 30 minutos a 120V e o material genético visualizado no gel por utilização de um transiluminador (UVITEC, Reino Unido).

3.4.2. Amplificação do fragmento do gene *gyrA*

Fragmentos da região QRDR do gene *gyrA*, com dois tamanhos diferentes, foram amplificados por PCR partindo da estirpe *A. butzleri* AB28/11, usando para tal dois pares de oligonucleótidos iniciadores listados na tabela 3.2.

Para a mistura reacional foi utilizado 5 µL de Dream Taq Green Buffer (10x) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) (NZYtech, Portugal), 0,5 µM de oligonucleótidos iniciadores, 2U de enzima Dream Taq Polimerase (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) e perfazendo a um volume final de 45 µL com água ultrapura, adicionando-se por fim 5 µL de gDNA da estirpe AB28/11. Depois de efetuada a mistura reacional, os tubos de PCR foram incubados num termociclador (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD, Estados Unidos da América), iniciando o processo com um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos por um primeiro passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguido de hibridização a 52°C (fragmento de 344 pb) ou 54°C (fragmento de 1410pb) durante 30 segundos e por fim uma extensão a 72°C durante 60 segundos. Finalmente foi realizada uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. Os produtos amplificados foram posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose de 1% (p/v) em tampão TAE 1x e corado com Midori Green (NIPPON Genetis, Alemanha), sendo sempre aplicado um marcador de peso molecular GRS Universal Ladder (GRiSP, Portugal). A corrida eletroforética decorreu durante 30 minutos a 120V com o objetivo de separar os produtos de PCR de acordo com o seu tamanho seguido de visualização do gel sob luz UV num transiluminador (UVITEC, Reino Unido). Os fragmentos obtidos foram purificados com auxílio a um kit de purificação de produtos de PCR (NZYGelPure, NZYtech, Portugal). Por fim os produtos de PCR obtidos foram quantificados num nanoespectrofotómetro (NanoPhotometer, IMPLEN, Alemanha).

3.4.3. Amplificação da sequência portadora do gene que confere resistência à canamicina

Com o objetivo de verificar se o tipo de material genético existente no meio tem influência no processo de transformação, procedeu-se à amplificação de uma sequência portadora de uma cassette de resistência à canamicina, usando-se como *template* o DNA genómico da estirpe de *A. butzleri*

DQ40A1 Δ *cmeB*. Esta estirpe tem um gene codificante de uma proteína de membrana interna de uma bomba de efluxo, interrompido pela adição de uma cassette de resistência à canamicina. Para tal foi usado um par de oligonucleótidos iniciadores listados na tabela 3.2.

Para amplificação da região que contém a cassette de resistência, realizou-se uma mistura reacional utilizando 5 μ L de tampão Dream Taq Green (10x) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) (NZYtech, Portugal), 0,5 μ M de oligonucleótido iniciador *cmeB_A1* e *cmeB_B2*, 2U de enzima Dream Taq Polimerase (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) e 5 μ L de gDNA da estirpe DQ40A1 Δ *cmeB*, perfazendo a um volume final de 50 μ L com água ultrapura. Após a preparação da mistura reacional, os tubos de PCR foram incubados no termociclador, iniciando-se o processo de amplificação com um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos por um primeiro passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguido de hibridização a 52°C durante 30 segundos e por fim uma extensão a 72°C durante 60 segundos, finalmente uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 1% (p/v) em tampão TAE 1x e corado com Midori Green, sendo aplicado um marcador de peso molecular. A corrida eletroforética decorreu durante 30 min a 120 V com o objetivo de separar os produtos de acordo com o seu tamanho, seguido de visualização sob luz UV num transiluminador. O fragmento obtido foi purificado com auxílio a um kit de purificação de produtos de PCR (NZYGelPure, NZYtech, Portugal). Por fim os produtos foram quantificados num nanoespectrofotómetro (NanoPhotometer, IMPLLEN, Alemanha). Com isto foi assim possível obter um fragmento que abrangia uma região de 390 pb a montante da cassette de resistência até 398 pb a jusante, correspondendo ao gene *cmeB* interrompido por uma cassette de resistência à canamicina.

Tabela 3.2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para as reações de PCR descritas nos pontos 3.4.2 e 3.4.3

Designação dos oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador (5'→3')	Tamanho do oligonucleótido iniciador (pb)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
gyrA_Fw	TGGACGTGCATTACCAGATG	20	1410
gyrA_Rv	GCAACTTTTCCTTTCCACCT	21	
F-QRDR	TGGATTAAAGCCAGTTCATAGAAG	24	344
R2-QRDR	TCATMGWATCATCATAATTTGGWAC	25	
cmeB_A1	TTGAAATAAGGGCTACTTACTCAGG	25	1638
cmeB_B2	GTTGCTCTGGCTTGCAAAT	20	

Nota: O produto de PCR de 344 pb foi sequenciado para confirmar que a mutação associada à resistência à ciprofloxacina se encontrava presente (Anexo 1). Nos oligonucleótidos iniciadores o W corresponde a uma adenina ou timina e o M a uma adenina ou uma citosina.

3.5. Avaliação de protocolos de transformação natural de *Arcobacter butzleri*

Com o objetivo de avaliar a capacidade de transformação natural em *A. butzleri* começou por se testar métodos descritos para outras espécies próximas, *H. pylori* e *Campylobacter jejuni*. Para avaliação dos diferentes protocolos, foi usado o gDNA da estirpe *A. butzleri* AB28/11 o qual possui uma mutação pontual no gene da DNA girase A (*gyrA*), na região determinante de resistência às fluoroquinolonas, onde na posição 254 ocorre uma transição de citosina para timina, correspondendo à troca do aminoácido treonina por isoleucina, que lhe confere fenótipo de resistência à ciprofloxacina. Após cada protocolo a frequência de transformação foi calculada considerando o número de colónias transformadas por mL, ou seja, o número de células contendo o material genético transferido horizontalmente, sobre o número total de unidades formadoras de colónias totais por mL, por micrograma de DNA. Todos os ensaios foram realizados em três dias independentes.

3.5.1. Métodos de transformação natural, com utilização de protocolos em meio sólido

Um dos métodos utilizados para transformar microrganismos, consiste no crescimento do mesmo e posterior transformação em meio sólido. No caso do estudo e transformação de *A. butzleri* foram utilizados protocolos de transformação descritos para *C. coli*, *C. jejuni* (Vegge et al., 2012; Wang & Taylor, 1990) e *H. pylori* (Israel et al., 2000), com o objetivo de verificar se este microrganismo seria naturalmente transformável por um dos métodos descritos. Os métodos de transformação encontram-se esquematicamente representados na figura 3.1.

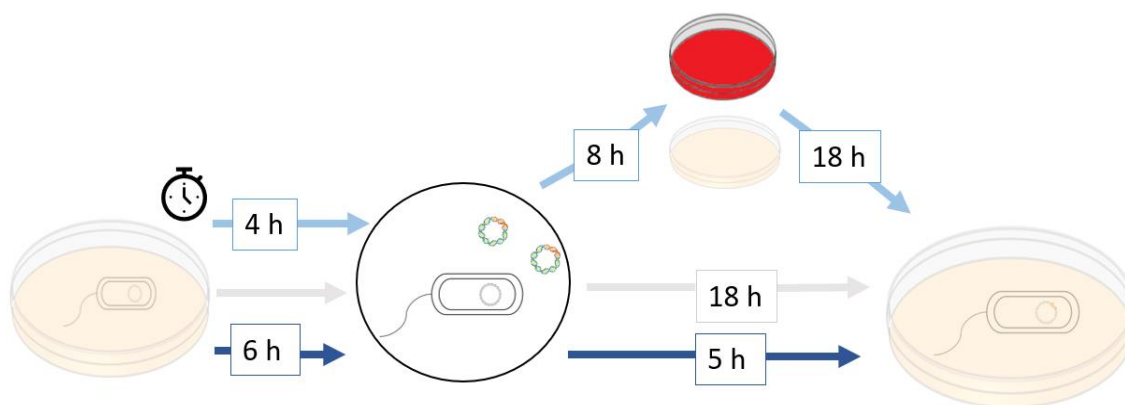


Figura 3.1. Representação esquemática dos métodos de transformação em meio sólido. O método A encontra-se a cinzento, o método B encontra-se a azul escuro e a azul claro encontra-se o método C.

3.5.1.1. Método A

Um dos processos de transformação em meio sólido utilizado, baseou-se no método experimental usado por Israel et al., (2000) para transformar *H. pylori*. Assim a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1, reconhecida em trabalhos prévios como naturalmente transformável (Silva, 2017), foi inoculada em meio TSA e incubada a 37°C durante 24 horas, em atmosfera de microaerofilia. Após incubação, a

biomassa foi transferida para 1 mL de PBS e centrifugada a 8500 \times g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em 300 μ L de PBS. Recolheram-se 25 μ L desta suspensão celular, aos quais foi adicionado 1 μ g de gDNA proveniente da estirpe de *A. butzleri* AB28/11 (mistura de transformação), tendo sido em paralelo, realizado um controlo no qual o gDNA foi substituído por água estéril. Com a mistura anterior foram inoculadas placas de TSA não seletivas, tendo estas sido incubadas por 18 horas a 37°C em microaerofilia. Após incubação, a biomassa foi transferida para 1 mL de PBS a partir do qual foram realizadas diluições sucessivas decimais (10^{-1} e 10^{-2}). A partir da suspensão celular bem como das diluições foram retiradas alíquotas de 100 μ L, sendo estas transferidas para placas de TSA seletivas contendo 4 μ g/mL de ciprofloxacina. A contagem das UFC/mL totais foi realizada como descrito anteriormente usando placas de TSA, sendo de seguida incubadas nas condições anteriormente referidas, durante 4 dias. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

3.5.1.2. Método B

Para a transformação em meio sólido baseado no protocolo descrito para *Campylobacter*, procedeu-se de acordo com o descrito por Wang & Taylor (1990) com algumas modificações. A estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 foi cultivada em TSA a 37°C, sob condições de microaerofilia durante 24 horas. Posteriormente 5×10^8 UFC/mL foram suspensas em 200 μ L de TSB e transferidas para uma nova placa de TSA, sendo esta incubada nas condições anteriormente descritas durante 6 horas. No fim deste período de incubação, adicionou-se 1 μ g de gDNA ajustado a um volume de 40 μ L, ou o mesmo volume de água estéril como controlo negativo, às células incubando-se sob microaerofilia a 37°C durante mais 5 horas. Por fim, foram realizadas diluições sucessivas da biomassa em PBS, sendo estas transferidas para placas não seletivas, para contagem das UFC/mL totais e também para placas seletivas contendo 4 μ g/mL de ciprofloxacina, para seleção das UFC transformantes/mL. As placas seletivas e não seletivas foram incubadas sob condições de microaerofilia, durante um período de 5 dias até ao aparecimento de colónias características de *A. butzleri*. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

3.5.1.3. Método C

Um dos métodos utilizado para transformar *A. butzleri* em meio sólido foi baseado na metodologia descrita por Silva (2017). Inicialmente, a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 foi repicada em placas de BA incubando-se por 24 horas a 37°C em condições atmosféricas de microaerofilia. Após incubação, as células foram ressuspensas em 200 μ L de meio TSB e espalhadas em placas de BA, incubando-se por mais 4 horas nas mesmas condições. Em duas áreas distintas das placas foram adicionados 1 μ g de gDNA num volume de 40 μ L e como controlo negativo 40 μ L de água, incubando-se as placas por mais 8 horas sob as condições acima referidas. Ao fim do tempo de incubação, as culturas foram transferidas para uma nova placa de BA não seletiva, sendo incubada por mais 18 horas. No final desse período, a biomassa foi transferida para 1 mL de tampão fosfato salino (PBS), a partir do qual foram realizadas diluições decimais (10^{-1} e 10^{-2}). Tanto da suspensão celular como das diluições realizadas foram

transferidos 100 µL para placas de BA suplementadas com 4 µg/mL de ciprofloxacina, para seleção das UFC transformantes/mL. Para contagem das UFC totais/mL realizaram-se diluições sucessivas do inóculo em PBS, sendo as mesmas transferidas para placas não seletivas de BA. As placas foram incubadas por mais 2 a 7 dias até serem obtidas colônias típicas de *A. butzleri* e de modo a ser estabelecido um período de incubação fixo para obtenção do número máximo de transformantes. O número de transformantes foi registado e a frequência de transformação foi avaliada aos 3, 4, 5, 6 e 7 dias de incubação. O mesmo protocolo foi realizado substituindo o meio BA por TSA. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

3.5.1.3.1. Efeito da temperatura e das condições atmosféricas na frequência de transformação

A temperatura e a concentração de oxigénio são dois parâmetros que variam em função do meio ambiente onde o microrganismo se encontra, podendo ter um papel na frequência de transformação. Com o objetivo de estudar a influência da temperatura e das condições atmosféricas na frequência de transformação em *A. butzleri*, procedeu-se de acordo com o método de transformação C, fazendo variar os parâmetros referidos. Assim, as temperaturas testadas foram 30 e 37°C, tanto em aerobiose como microaerofilia. Por fim as frequências de transformação foram calculadas e comparadas entre si, de modo a verificar se o efeito destes parâmetros na transformação de *A. butzleri*.

3.5.1.3.2. Transformação de diferentes estirpes de *Arcobacter butzleri*

Para além de se ter procedido à transformação da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 avaliou-se se mais estirpes de *A. butzleri* eram naturalmente transformáveis. Deste modo procedeu-se à avaliação da frequência de transformação das estirpes de *A. butzleri* AB22/11, 2003-1426, AB45/11 e CR113-2, usando como DNA dador o gDNA da estirpe AB28/11. Para esta avaliação foi utilizado o procedimento descrito como método C, usando-se o meio BA, tendo-se estabelecido uma temperatura de incubação de 30°C e como período de incubação 120 horas.

3.5.2. Métodos de transformação natural, com utilização de protocolos em meio líquido

A transformação em meio líquido foi baseada no método utilizado por Wilson et al., (2003), com modificações, tendo sido testadas as temperaturas de 30°C e 37°C. Inicialmente a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 foi repicada em meio BA, incubando-se sob condições de microaerofilia por 24 horas. Após incubação, recolheu-se uma colónia, a qual foi usada para iniciar uma cultura numa placa de 6 poços com 4 mL de meio, tendo-se testado os meios TSB, TSB com 5% de soro fetal bovino, TSB com 0,4% de extrato de levedura e BHI, a qual foi incubada por 24 horas, sob condições de microaerofilia.

Posteriormente transferiram-se 100 µL da cultura anterior para erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL do meio correspondente, incubando-se sob condições de microaerofilia a 100 rpm. Após 2, 4 e 6 horas, foram transferidos 1,5 mL de meio para placas de Petri de 35 mm, onde foram adicionados 1 µg de DNA, ou água como controlo negativo, seguindo-se uma incubação por mais 5 horas sob condições de microaerofilia a 100 rpm. Por fim a cultura foi transferida para placas seletivas contendo 4 µg/mL de ciprofloxacina para enumeração das UFC transformantes/mL e para placas não seletivas para obtenção das UFC totais/ mL.

3.5.3. Métodos de transformação natural, com utilização de protocolo em sistema bifásico

Na transformação em sistema bifásico, baseado no protocolo descrito para *Campylobacter*, procedeu-se de acordo com o descrito por Wang & Taylor (1990), com modificações. Inicialmente a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 foi incubada em placas de TSA durante 24 horas, sob condições de microaerofilia a 37°C. Após a incubação, 5x10⁸ UFC/mL em 200 µL de TSB foram adicionadas a tubos de ensaio (10 por 120mm) contendo 1,5 mL de meio TSA, sendo os mesmos incubados por 6 horas a 30°C sob condições de microaerofilia. Posteriormente foi adicionado 1 µg de gDNA ou 40 µL de tampão como controlo negativo aos tubos, sendo estes incubados novamente por mais 5 horas sob condições de microaerofilia, a uma temperatura de 37°C. Por fim realizaram-se diluições sucessivas do inóculo em PBS, transferindo-se o mesmo para placas não seletivas de TSA, para contagem das UFC totais /mL e para placas seletivas de TSA para contagem das UFC transformantes/mL, incubando-se as mesmas nas condições já referidas durante 5 dias até ao aparecimento de colónias típicas de *A. butzleri*.

Com o objetivo de testar se a transformação natural podia estar dependente do meio de cultura usado, o mesmo protocolo foi testado, substituindo o meio TSA por meio BA. Este último foi ainda utilizado para: determinar a frequência de transformação de acordo com a fase de crescimento; avaliar a saturação pelo material genético; analisar a frequência de transformação na presença de DNA competidor; Estudo cinético da incorporação do material genérico; e estudar a transformação em coculturas bacterianas.

3.6. Determinação das curvas de crescimento das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 e DQ40A1Δ*cmeB*

Com o objetivo de verificar se a inserção de uma cassette de resistência ou a interrupção do gene *cmeB* afeta o crescimento bacteriano, realizou-se uma curva de crescimento das estirpes de *A. butzleri* DQ40A1Δ*cmeB* e DQ40A1, a respetiva estirpe nativa. Inicialmente as estirpes, cresceram a 30 °C durante 24 horas sob microaerofilia em placas de TSA, tendo sido posteriormente usadas para iniciar uma pré-cultura em TSB com uma DO_{620nm} inicial de 0,05, esta foi então incubada durante 18 horas a 30°C, com uma agitação de 100 rpm e sob condições de microaerofilia. Com a pré-cultura foi iniciada uma cultura com uma DO_{620nm}= 0,02 a qual foi incubada sob as mesmas condições, tendo sido

recolhidas amostras após 0; 2,5; 5; 7,5; 10, 12,5 e 24 horas, para leitura da DO_{620nm}. As curvas foram realizadas em três dias independentes.

3.7. Transformação de *Arcobacter butzleri* com diferentes materiais genéticos

No meio ambiente, os microrganismos encontram-se em contacto com diferentes tipos de material genético, quer libertados por microrganismos da mesma espécie, quer por espécies diferentes, além disso o mesmo material genético pode encontrar-se degradado no meio. Assim de modo a avaliar se diferentes tipos de materiais genéticos têm efeito na frequência de transformação e comparar as frequências obtidas entre eles, utilizou-se o método de transformação em sistema bifásico descrito no ponto 3.5.3. O material genético utilizado, consistiu nos fragmentos amplificados anteriormente como descrito na subsecção 3.4, bem como o gDNA das estirpes de *A. butzleri* CR113-2 Δ *cmeB*, DQ40A1 Δ *cmeB*, AB28/11 e da estirpe de *C. coli* 873, que possui uma cassete de resistência à gentamicina (Duarte et al., 2014). Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

3.8. Curva de saturação pela concentração DNA exógeno

No meio onde se encontram, as bactérias mantêm-se em contacto com diferentes concentrações de material genético, podendo a concentração do mesmo ter influência na sua frequência de transformação. Com vista a avaliar se a concentração de material genético tem influência neste processo, foram testadas várias concentrações de gDNA proveniente da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB*. Para isso foram adicionados à cultura em sistema bifásico 10, 100, 500 ng, 1 e 2 μ g de gDNA e usando como estirpe recetora *A. butzleri* DQ40A1. A transformação foi realizada usando o sistema bifásico a 30°C e sob condições de microaerofilia. Por fim procedeu-se à determinação dos transformantes (UCF)/ UFC totais, em função da concentração de material genético adicionado. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

3.9. Avaliação da influência da fase de crescimento na transformação de *Arcobacter butzleri*

A fase de crescimento pode influenciar a competência natural das bactérias e por sua vez a frequência de transformação. Assim, dependendo do estado fisiológico, as células bacterianas podem encontrar-se mais ou menos suscetíveis à captação de material genético. De modo a averiguar se a fase de crescimento das células influencia a transformação, foram testados os tempos de incubação de 2, 4, 6 e 12 horas das células nos tubos com meio bifásico, antes da adição do gDNA. Após os períodos de incubação, foi realizada uma contagem das UFC totais/mL e, posteriormente, foi adicionado o gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB*, de acordo com o descrito anteriormente. Os resultados foram

avaliados por análise da frequência de transformação obtida para cada tempo de cultura. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

3.10. Cinética de transformação

A incorporação do material genético é um processo gradual, que depende do número de microrganismos que desenvolve competência ao longo do tempo. Assim, com o objetivo de avaliar a cinética de transformação natural em *A. butzleri*, utilizou-se o método bifásico, com algumas alterações ao protocolo original. Inicialmente, para validar a utilização da enzima DNase para degradação do DNA no meio de cultura, esta foi incubada com DNA em água e em meio de cultura, durante 2 horas a 30°C, usando 1 µg de gDNA e 100 µg/mL DNase. A visualização das amostras foi feita em gel de agarose, seguida de visualização sob luz UV num transiluminador. Após confirmação da atividade da DNase, a estirpe DQ40A1 foi repicada em placas de BA e incubada sob condições de microaerofilia a 30°C durante 24 h. Posteriormente 5x10⁸ UFC/mL em 200 µL de TSB foram transferidas para tubos de ensaio (10 por 120mm) com 1,5 mL de meio BA, incubando-os durante 6 horas. Seguidamente foi adicionado 1 µg de gDNA da estirpe *A. butzleri* DQ40A1Δ*cmeB*, cada transformação individual foi interrompida aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300 minutos pela adição de 100 µg/mL de DNase, após a qual se seguiu um período de incubação de 2 horas, nas condições anteriormente descritas, para expressão fenotípica (Vegge et al., 2012). Por fim foi retirada uma amostra de inóculo correspondente a cada tempo e posteriormente realizadas diluições sucessivas do mesmo em PBS, transferindo 100 µL da cultura ou diluições para placas com 30 µg/mL de canamicina, para contagem dos transformantes (UFC)/mL e para placas não seletivas de TSA, para contagem das UFC totais /mL. Por fim foi determinado o número de transformantes (UFC)/ UFC totais/mL para cada tempo de incubação. Cada ensaio foi realizado em três dias independentes.

3.11. Efeito da presença de DNA competidor na transformação de *Arcobacter butzleri*

No meio ambiente os microrganismos encontram-se em contacto com material genético que é libertado por diversas espécies bacterianas, resultante da morte das células bacterianas ou por libertação controlada do DNA. Com o objetivo de verificar se a existência de gDNA exógeno afeta a frequência de transformação, procedeu-se à realização do método de transformação como descrito no ponto anterior, usando assim as concentrações de 10, 100, 500 e 1000 ng de gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1Δ*cmeB*, e adicionando 1 µg de gDNA da estirpe de *H. pylori* ATCC26695 ou 1 µg de gDNA da estirpe de *C. jejuni* NCTC11168.

3.12. Troca de material genético entre coculturas bacterianas

O ensaio de troca de material genético em coculturas, foi realizado com o objetivo de observar a possibilidade de transferência de material genético durante o crescimento *in vitro* entre culturas bacterianas. Para tal, inicialmente as estirpes *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB* e 851 (contendo uma mutação pontual na QRDR que confere resistência à ciprofloxacina) foram repicadas em placas de BA e incubadas a 30°C sob condições de microaerofilia durante 24 horas. Após incubação, 5×10^8 UFC/mL em 200 μ L TSB de cada cultura foram adicionadas a tubos de ensaio (10 por 120mm) contendo 1,5 mL de meio BA, tendo sido preparados tubos independentes para cada tempo de incubação (0, 3, 8 e 24 horas). A cada tudo foi retirada uma amostra de inóculo, ao tempo de incubação indicado, tendo sido realizadas diluições sucessivas da amostra em PBS. As diluições sucessivas foram então transferidas para placas com 30 μ g/mL de canamicina ou 4 μ g/mL ciprofloxacina, para a contagem das UFC/mL de cada estirpe. Também, 100 μ L de inóculo e diluição 10^{-1} foram transferidos para placas de BA com 30 μ g/mL canamicina e 4 μ g/mL ciprofloxacina, para contagem das UFC/mL da bactéria com resistência a ambos os antibióticos. Os ensaios foram realizados em três dias independentes.

Capítulo 4- Resultados e discussão

4.1. Suscetibilidade aos antibióticos

A utilização de material genético dador, portador de genes ou mutações pontuais, associados a resistência a antibióticos, possibilita a seleção de transformantes, num processo de transformação. Esta estratégia tem sido largamente utilizada para o estudo dos parâmetros que influenciam a capacidade de transformação natural em bactérias tanto da mesma família como de famílias próximas de *A. butzleri*, como é o caso dos métodos usados para transformar *C. coli*, *C. jejuni* e *H. pylori* (Israel et al., 2000; Vegge et al., 2012; Wang & Taylor, 1990). Nestes processos recorre-se geralmente a gDNA de estirpes que são resistentes a um determinado antibiótico, possuindo uma mutação pontual ou determinante de resistência responsável pelo perfil fenotípico, possibilitando posteriormente a seleção das bactérias que incorporaram esse material genético. Assim, para a realização deste trabalho, utilizou-se como material genético dador gDNA ou produtos de amplificação de regiões específicas das estirpes de *A. butzleri* AB28/11, DQ40A1 Δ *cmeB*, CR113-2 Δ *cmeB* e da estirpe de *C. coli* 873, com marcas de resistência aos antibióticos ciprofloxacina, canamicina ou gentamicina. Primeiramente, de modo a avaliar a suscetibilidade das estirpes recetoras a utilizar neste trabalho, procedeu-se à determinação da concentração mínima inibitória dos antibióticos mencionados. Este é um parâmetro fundamental na determinação da suscetibilidade de microrganismos permitindo estabelecer por sua vez uma concentração para a qual é possível fazer a seleção de mutantes. Os valores de CMI obtidos para as várias estirpes de *A. butzleri* utilizadas neste estudo encontram-se apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Concentração mínima inibitória dos antibióticos ciprofloxacina, canamicina e gentamicina para as diferentes estirpes recetoras de *Arcobacter butzleri* usadas neste estudo.

Estirpe de <i>A. butzleri</i>	CMI (μ g/mL)		
	Ciprofloxacina	Canamicina	Gentamicina
AB22/11	0,25	8	ND
AB45/11	1	8	ND
CR113-2	0,06	16	ND
DQ40A1	0,125	16	4
2003/1426	0,25	8	ND
DQ40A1 Δ <i>cmeB</i>	0,125	≥ 1024	ND
851	16	8	ND

Nota: Os pontos de corte de resistência são: ciprofloxacina ≥ 4 μ g/mL; gentamicina ≥ 8 μ g/mL (Ferreira et al., 2013) e canamicina ≥ 100 μ g/mL (Kabeya et al., 2004). (ND) Não determinado

Pela determinação da CMI de cada antibiótico obtidas para as diferentes estirpes bacterianas, verificou-se que todas as estirpes nativas eram suscetíveis à ciprofloxacina e canamicina, bem como a estirpe DQ40A1 à gentamicina, validando a sua utilização como estirpes recetoras tanto do material genético

proveniente das estirpes de *A. butzleri* AB28/11, como das DQ40A1 Δ *cmeB* e CR113-2 Δ *cmeB*, ou da estirpe *C. coli* 873 (portadora de cassete de resistência à gentamicina *aphA-3*) (Duarte et al., 2014). A concentração padrão de cada um dos antibióticos para seleção dos mutantes foi estabelecida como 4 μ g/mL para a ciprofloxacina e no caso da canamicina foi definida a concentração de 30 μ g/mL. Já para a seleção dos mutantes originados a partir da estirpe DQ40A1, com resistência à gentamicina, foi estabelecida a utilização de uma concentração de 8 μ g/mL para este antibiótico.

4.2. Avaliação de diferentes protocolos de transformação natural

4.2.1. Transformação natural em meio sólido

De modo a verificar se *A. butzleri* é naturalmente transformável, nomeadamente por métodos de transformação descritos para outros microrganismos, como *C. coli*, *C. jejuni* e *H. pylori* (Israel et al., 2000; Vegge et al., 2012; Wang & Taylor, 1990), foi utilizada como estirpe recetora *A. butzleri* DQ40A1 e como material genético dador o gDNA da estirpe de *A. butzleri* AB28/11 (com resistência à ciprofloxacina associada a uma mutação pontual C254T na região QRDR do gene *gyrA*).

Inicialmente foram testados os métodos de transformação em meio sólido A, B e C descritos no ponto 3.5.1, sendo que todos os ensaios foram realizados a 37°C, sob condições de microaerofilia. Não foi possível transformar *A. butzleri* pelos métodos A e B de transformação natural em meio sólido. Para estes métodos foi estabelecida a utilização de meio TSA, tal como descrito no método de transformação utilizado em *H. pylori* (Israel et al., 2000) e porque também é um meio de cultura vulgarmente utilizado para crescimento de *A. butzleri* (Ferreira et al., 2018). A utilização do método de transformação C, quando usando meio BA, foi possível transformar *A. butzleri* tendo-se obtido uma frequência de transformação para a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 a 37°C e sob condições de microaerofilia de $1,12 \times 10^{-5} \pm 6,81 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ (μ g DNA x UFC totais). A frequência de transformação obtida é inferior aos valores obtidos para *C. coli* ($\sim 10^{-3}$), *C. jejuni* ($\sim 10^{-4}$) (Wang & Taylor, 1990) e *H. pylori* ($\sim 1,3 \times 10^{-4}$) (Israel et al., 2000), pelos protocolos usados no métodos A e B.

Através do método utilizado por Silva (2017), método C, foi possível validar que *A. butzleri* é naturalmente transformável. Foi ainda possível, com a utilização deste método, estabelecer um período de incubação para o qual se obtém o número máximo de mutantes. Por observação da figura 4.1, onde se encontra apresentado o número de transformantes (UFC)/mL em função do tempo de incubação, verifica-se que entre as 96 e as 120 horas, ou seja, entre 4 e 5 dias de incubação, o número de transformantes (UFC)/mL não varia. O tempo de incubação para obtenção de transformantes está de acordo com o descrito para outros microrganismos de famílias próximas de *A. butzleri*, como é o caso de *H. pylori*, onde são utilizados 4 dias de incubação (Israel et al., 2000). De modo a garantir a obtenção do máximo de transformantes no processo, neste trabalho estabeleceu-se o período de incubação fixo de 120 horas.

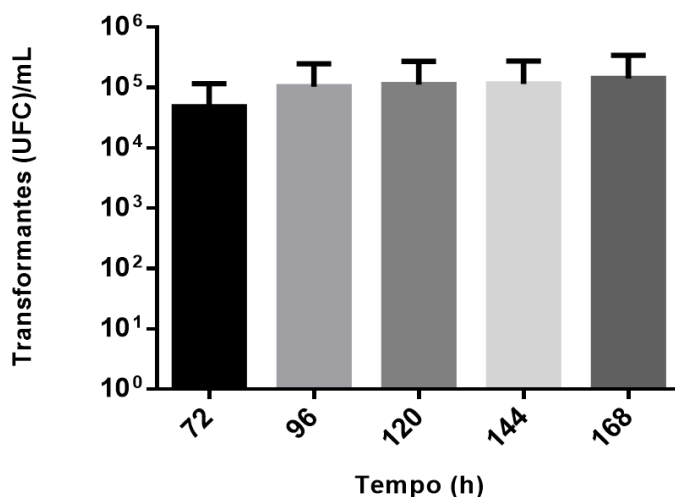


Figura 4.1. Representação gráfica dos transformantes (UFC)/mL em função do tempo de incubação, utilizando o método C de transformação natural em meio sólido a 37°C e sob condições de microaerofilia. Resultados mostram a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, realizados para cada período de incubação.

Na avaliação do método C analisou-se ainda a influência do meio de cultura utilizado na transformação natural, verificando-se que com a substituição do meio BA pelo meio TSA deixa de ser possível obter transformantes de *A. butzleri*. Assim, o facto de não ocorrer transformação em meio TSA e por outro lado, a mesma se verificar com a utilização de BA, poderá indicar que a constituição do meio tem influência no processo de obtenção de transformantes. A influência da composição dos meios usados para transformação natural está descrita para outras bactérias de Gram-negativo, tais como bactérias do género *Aeromonas*, bem como para a espécie *Azotobacter vinelandii*, em que a presença de determinados componentes influencia o processo de transformação (Huddleston et al., 2013; Page & Sadoff, 1976). De facto, em bactérias de Gram-negativo como *Histophilus somni*, a frequência de transformação é melhorada quando o meio possui adenosina cíclica monofosfato (cAMP- do inglês cyclic adenosine monophosphate) (Shah et al., 2014). Também para *Acinetobacter calcoaceticus* e *Myxococcus xanthus*, a frequência de transformação é influenciada pela presença de cátions divalentes, no meio de cultura, que contribuem positivamente para o processo de transformação (Palmen et al., 1993; Wang et al., 2011). A presença de iões no meio, por exemplo, influencia inclusive a transformação em bactérias de Gram-positivo como *Bacillus subtilis* (Romanowski et al., 1993). A presença de iões carregados positivamente destabiliza a superfície da parede que se encontra carregada negativamente, facilitando como consequência a passagem do material genético (Asif et al., 2017). Estas observações são indicativas de que determinados constituintes do meio de cultura, podem influenciar o processo de transformação. No caso do presente estudo, os resultados obtidos sugerem que o meio BA possui na sua constituição, um ou mais componente(s) que não existe no meio TSA, e que desencadeia o estado de competência em *A. butzleri*. Uma vez que se tratam de meios complexos, com uma constituição relativamente semelhante, pode-se sugerir que o(s) componente(s) podem encontrar-se ou no sangue adicionado, ou mesmo no extrato de carne que se encontra na composição do meio BA e que não está presente no meio TSA.

Também as condições usadas para a transformação podem desempenhar um papel importante na obtenção de transformantes, podendo este processo ser influenciado não só pelos nutrientes disponíveis, como pelo perfil genético das estirpes, mas também pela fase de crescimento, condições de incubação, ou mesmo tipo de material genético adicionado (Huddleston et al., 2013; Sikorski et al., 2002; Vegge et al., 2012). Considerando isto, existem diversos parâmetros que devem ser avaliados para melhor compreender o processo de transformação natural em *A. butzleri*.

4.2.1.1. Influência da temperatura e condições atmosféricas na transformação natural

O processo de transformação natural, caracteriza-se por ocorrer sob condições normais de crescimento, no entanto, esta pode ser influenciada por fatores externos (Liu et al., 2014). A temperatura e as condições atmosféricas, são dois dos fatores que influenciam não só o crescimento microbiano como também a frequência de transformação. De facto, em bactérias de Gram-negativo, tais como, *A. vinelandii* (Page & Sadoff, 1976), *Vibrio* sp. (Frischer et al., 1993) e *C. jejuni* (Vegge et al., 2012), a temperatura e as condições atmosféricas são dois dos principais fatores com impacto na frequência de transformação destes microrganismos. Nas bactérias referidas anteriormente por exemplo, a transformação é favorecida quando é realizada sob as condições ótimas de crescimento do microrganismo, no entanto as frequências de transformação obtidas, podem variar dentro dos intervalos ótimos de crescimento. Assim, é importante avaliar a influência destes parâmetros na competência natural de *A. butzleri*, com a finalidade de se esclarecer quais as melhores condições para transformar esta bactéria.

Para esclarecer acerca da influência da temperatura de incubação e das condições atmosféricas no processo de transformação, foram testadas as duas temperaturas e duas condições atmosféricas, para as quais ocorre crescimento de *A. butzleri*, através do método de transformação C e à semelhança do que foi realizado por outros autores para *C. jejuni* (Vegge et al., 2012). Assim, foram testadas as temperaturas de 30 e 37°C e as condições atmosféricas de microaerofilia e aerobiose. Os resultados das frequências de transformação obtidos, para cada condição, encontram-se apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Frequência de transformação, em transformantes (UFC)/ (µg DNA x UFC totais), obtida para a estirpe de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 a temperatura e condições atmosféricas variáveis.

Temperatura	Nível de oxigênio	
	Aerobiose	Microaerofilia
30°C	$3,78 \times 10^{-9} \pm 7,22 \times 10^{-10}$	$2,08 \times 10^{-5} \pm 1,76 \times 10^{-5}$
37°C	NT	$1,12 \times 10^{-5} \pm 6,81 \times 10^{-6}$

NT- Não transformável

Através dos resultados obtidos é possível constatar que a maior frequência de transformação média foi atingida utilizando uma temperatura de 30°C e uma atmosfera de microaerofilia, no entanto obtendo-se valores muito próximos quando o protocolo de transformação foi realizado a 37°C, mas em microaerofilia. Verificando-se assim que o efeito da temperatura em *A. butzleri*, tem um menor impacto no processo de transformação natural do que as condições atmosféricas. Em *C. jejuni*, por exemplo, o processo de transformação ocorre tanto em condições de aerobiose, como de microaerofilia, no entanto é a temperatura que tem maior influência sob a frequência de transformação, uma vez que a redução da temperatura, tem como consequência uma redução drástica da transformação, quando comparada com a alteração da condições atmosféricas (Vegge et al., 2012). A temperatura e as condições atmosféricas, são assim dois dos parâmetros que podem influenciar a frequência de transformação. *A. butzleri* quando comparado com *C. jejuni*, para o qual uma temperatura de 42°C promove um aumento considerável do número de transformantes, necessita de uma temperatura mais baixa para atingir a sua frequência de transformação mais elevada. Por outro lado, à temperatura de 37°C e a uma atmosfera de aerobiose, não foi possível obter transformantes, o que sugere que nestas condições *A. butzleri* não é naturalmente transformável.

Assim, as condições de incubação a 30°C e uma atmosfera de microaerofilia, identificadas como sendo as mais favoráveis para a transformação em *A. butzleri* obtidas neste ensaio, foram utilizadas para os restantes ensaios realizados durante este estudo.

4.2.1.2. Frequências de transformação num grupo de estirpes de *Arcobacter butzleri*

Após se ter confirmado que a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 é naturalmente transformável e que a maior frequência de transformação é obtida à temperatura de 30°C e sob condições de microaerofilia, procedeu-se à avaliação da capacidade de transformação natural de outras estirpes nas condições definidas como ótimas. Para tal foi utilizado o método C de transformação em meio sólido e as frequências de transformação de cada estirpe registadas, encontrando-se representadas na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Frequências de transformação obtidas para as diferentes estirpes de *Arcobacter butzleri*, transformadas com o gDNA da estirpe AB28/11.

Estirpe de <i>A. butzleri</i>	Frequência de transformação (transformantes (UFC)/ (µg DNA x UFC totais))
AB22/11	NT
AB45/11	$2,13 \times 10^{-8} \pm 3,07 \times 10^{-9}$
CR113-2	$3,61 \times 10^{-6} \pm 2,29 \times 10^{-6}$
DQ40A1	$2,08 \times 10^{-5} \pm 1,76 \times 10^{-5}$
2003/1426	$1,13 \times 10^{-6} \pm 1,08 \times 10^{-6}$

NT- Não transformável

Pelas frequências de transformação obtidas é possível constatar que a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 é a que apresenta uma frequência de transformação mais elevada. De entre as cinco estirpes de *A. butzleri* estudadas, através do método de transformação C, quatro das cinco estirpes de *A. butzleri* testadas foram naturalmente transformáveis, apresentando valores de frequência de transformação entre $2,13 \times 10^{-8}$ e $2,08 \times 10^{-5}$ transformantes (UFC)/ (µg DNA x UFC totais).

A frequência de transformação é variável entre espécies, mas também entre estirpes. Os valores de frequência de transformação de diversas bactérias de Gram-negativo, como é o caso de *Chlorobium tepidum* ($\sim 10^{-7}$) (Frigaard & Bryant, 2001), *Methanococcus voltae* ($\sim 10^{-6}$) (Bertani & Baresi, 1987) e *Pseudomonas stutzeri* ($\sim 10^{-5}$) (Carlson et al., 1983) são bastante díspares. No entanto, o mesmo se observa entre estirpes, por exemplo, no trabalho de Kim et al. (2006), verificou-se que dependendo da origem da estirpe, a frequência de transformação obtida poderia diferir entre 10^{-5} e 10^{-8} , ou algumas estirpes não eram mesmo transformáveis, devendo-se possivelmente ao fato de serem geneticamente diferentes, e também à necessidade de requerimentos específicos para serem transformáveis.

O facto de ocorrer variação nas frequências dependendo do microrganismo que se considera bem como da estirpe que se utiliza, encontra-se, não só descrito para *C. coli* mas também para *Legionella pneumophila*, onde as estirpes testadas isoladas a partir de um surto ocorrido apresentavam frequências de transformação distintas (Juan et al., 2015). A variação da frequência, em função da origem encontra-se também descrita para *Haemophilus influenzae*, onde foram testados 35 isolados cujo número de colónias transformadas variaram dependendo da origem da estirpe (Maughan & Redfield, 2009). Em *P. stutzeri*, a transformação natural foi avaliada em 120 estirpes provenientes de uma amostra de solo, onde as estirpes apresentavam diferentes distâncias genéticas, tendo-se observado variações nas frequências de transformação obtidas, e onde apenas 43 dos isolados eram naturalmente transformáveis (Sikorski et al., 2002). Neste estudo, o valor de frequência de transformação mais baixo foi obtido para a estirpe de *A. butzleri* AB45/11, a qual foi isolada do mesmo local e no mesmo dia da estirpe AB22/11. Nas condições testadas não foi possível obter transformação para a estirpe de *A. butzleri* AB22/11, o que indica que dentro da espécie *A. butzleri* poderão existir outras estirpes que não apresentam competência natural. No entanto, para poder tirar conclusões

acerca de uma possível associação da origem da estirpe com a competência natural, teriam de ser realizados estudos com mais isolados.

Considerando que o valor de frequência de transformação mais elevado foi obtido para a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 foi estabelecido o seu uso como estirpe de referência para ensaios posteriores.

4.2.2. Transformação natural em meio líquido

A utilização de um protocolo de transformação em meio sólido dificulta a avaliação da influência de diversos parâmetros neste processo. A utilização de meio líquido na transformação em *C. jejuni*, por exemplo, permitiu avaliar parâmetros como a fase de crescimento e em que medida estes afetavam a frequência de transformação (Wilson et al., 2003), parâmetro que é mais difícil de controlar em meio sólido. Assim, com o objetivo de testar quais os parâmetros que podem influenciar a transformação natural de *A. butzleri*, houve necessidade de estabelecer um protocolo que permitisse padronizar e manipular os mesmos. Para tal, procedeu-se à avaliação da capacidade de transformação deste microrganismo em meio líquido, estudando diferentes temperaturas e diferentes composições do meio de transformação. Assim, considerando que em meio sólido se verificou uma influência da composição do meio de cultura na transformação de *A. butzleri*, avaliaram-se diferentes composições de meio líquido, sendo a transformação realizada nos meios de cultura TSB, TSB suplementado com 0,4% de extrato de levedura, TSB suplementado com 5% de soro fetal bovino e em meio BHI. Neste ensaio foram testadas as temperaturas de 30°C e 37°C. Após o crescimento nos meios de cultura líquidos, foram transferidas para placas contendo o meio seletivo sólido correspondente. A transformação da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 apenas se verificou ocorrer em um de entre os três ensaios independentes realizados, com uma frequência de transformação de $7,23 \times 10^{-10}$ transformantes (UFC)/(μg DNA x UFC totais), no ensaio realizado à temperatura de 30°C e usando o meio de cultura TSB. Nos restantes ensaios, a frequência de transformação obtida encontrava-se abaixo do limite de deteção para este método não tendo por esse motivo sido considerada. A frequência de transformação obtida em meio líquido encontra-se então muito abaixo do obtido para *A. butzleri* DQ40A1 quando usando um protocolo em meio sólido (método C). Como já referido para bactérias de Gram-negativo e também no caso de bactérias de Gram-positivo, como por exemplo para *B. subtilis*, foi verificado que a composição do meio de transformação tem influência na frequência de transformação obtida (Bräutigam et al., 1997). Em *H. influenzae*, por exemplo, apesar de não se conhecer o fator que desencadeia a competência, esta é desenvolvida quando há limitação de nutrientes no meio, podendo assim uma das cadeias de DNA servir como fonte de carbono, sendo a outra incorporada (Murphy et al., 2011). Para outros microrganismos e à semelhança do que parece ocorrer em *A. butzleri*, *H. somni* e *A. baylyi* são transformáveis quando existem determinados nutrientes no meio, nomeadamente cAMP e produtos da degradação de células, respetivamente, indicando que a sua presença pode estimular o desenvolvimento de competência (Pontiroli et al., 2009; Shah et al., 2014).

A transformação em meio líquido, a diferentes temperaturas, permitiu também concluir que esta tem influência na frequência de transformação obtida, suportando os resultados obtidos no ponto 4.2.1.1 e

estando de acordo com o descrito tanto para bactérias de Gram-positivo como *B. subtilis* (Dubnau, 1991), como para de Gram-negativo como *C. jejuni* (Vegge et al., 2012). É ainda de salientar e de acordo com os resultados anteriores, que a melhor temperatura para a transformação em *A. butzleri* é 30°C.

Os baixos valores de frequência de transformação e inconstância de resultados obtidos por este método dificultariam a avaliação da influência de alguns parâmetros neste processo, assim com o objetivo de estabelecer um protocolo que permita a obtenção de frequências de transformação de *A. butzleri* semelhantes às alcançadas pelo método C e que ainda permitisse retirar uma amostra mais homogênea do inóculo aquando da passagem do mesmo para placas seletivas, prosseguiu-se com a avaliação da transformação natural usando um sistema bifásico.

4.2.3. Transformação em sistema bifásico

O sistema bifásico envolve a utilização de meios sólido e meio líquido, sendo utilizado para estudos de transformação natural (Vegge et al., 2012). Na avaliação do processo de transformação natural em espécies de *Campylobacter*, o sistema bifásico foi já usado para avaliar a cinética de transformação, o efeito da fase de crescimento na frequência de transformação, bem como analisar o efeito da temperatura e da atmosfera na transformação (Vegge et al., 2012; Wang & Taylor, 1990).

Inicialmente este ensaio foi realizado em meio TSB, juntamente com TSA, no entanto, e à semelhança do que aconteceu noutros ensaios de transformação anteriores, com estes meios de cultura não foi possível obter transformantes. Como a composição do meio de cultura, logo de nutrientes disponíveis, parece ter influência neste processo, avaliou-se a utilização de BA como meio sólido, mantendo-se como meio líquido o TSB. Assim foi possível transformar *A. butzleri* em sistema bifásico, tendo-se obtido uma frequência de transformação de $7,64 \times 10^{-7} \pm 7,47 \times 10^{-7}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC totais}$). A frequência de transformação obtida, apesar de ser inferior à atingida pelo método C em meio sólido para esta estirpe, aponta este método de transformação como eficaz, sendo possível com o mesmo obter transformados num curto espaço de tempo. A diferença de resultados obtidos com ambos os meios testados, suportam mais uma vez a hipótese de que o meio BA, poderá possuir na sua constituição um elemento que desencadeia a competência. Como referido anteriormente o constituinte que desencadeia a competência poderá estar presente no sangue adicionado ou mesmo no extrato de carne que faz parte da composição da base do meio BA. Este protocolo possibilita também a avaliação de condições, que não seriam possíveis de ser testadas em meio sólido, como por exemplo controlar a concentração de UFC/mL adicionadas no início do processo de transformação. Assim para ensaios posteriores foi estabelecido a utilização deste método para transformar a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1.

4.3. Frequência de transformação em função de DNA de diferentes origens

Inicialmente os ensaios de transformação foram realizados usando gDNA da estirpe de *A. butzleri* AB28/11 como material genético dador, em condições normais de crescimento, as estirpes bacterianas

encontram-se em contacto com diferentes materiais genéticos de diferentes estirpes ou espécies, bem como fragmentos provenientes da degradação do mesmo. Com o objetivo de verificar de que modo o tipo de material genético influencia a transformação natural, utilizou-se *A. butzleri* DQ40A1 como estirpe recetora e diferentes materiais genéticos. O material genético utilizado consistiu em gDNA proveniente de diferentes estirpes dadoras de *A. butzleri*, bem como de uma espécie diferente (*C. coli*), que possuíam diferentes determinantes de resistência. Estes determinantes consistiam numa mutação pontual na região QRDR do gene *gyrA* que confere resistência à ciprofloxacina (González et al., 2017; Van den Abeele et al., 2016), uma cassette de resistência à canamicina (Silva, 2017) e uma cassette de resistência à gentamicina (Duarte et al., 2014), no último caso proveniente de uma espécie dadora diferente da espécie recetora. Para além disto, foram utilizados fragmentos de diferentes tamanhos contendo os determinantes de resistência já referidos. Estes fragmentos resultaram da amplificação através da técnica de PCR da QRDR do gene *gyrA* (344 pb), da amplificação de uma região a montante e a jusante da QRDR do gene da *gyrA* (1410pb), bem como de uma sequência portadora da cassette de resistência à canamicina (1638pb). O tamanho dos fragmentos obtidos foi confirmado por eletroforese em gel de agarose.

As frequências de transformação obtidas com cada um dos materiais genéticos, foram registadas e as mesmas encontram-se representadas na figura 4.2.

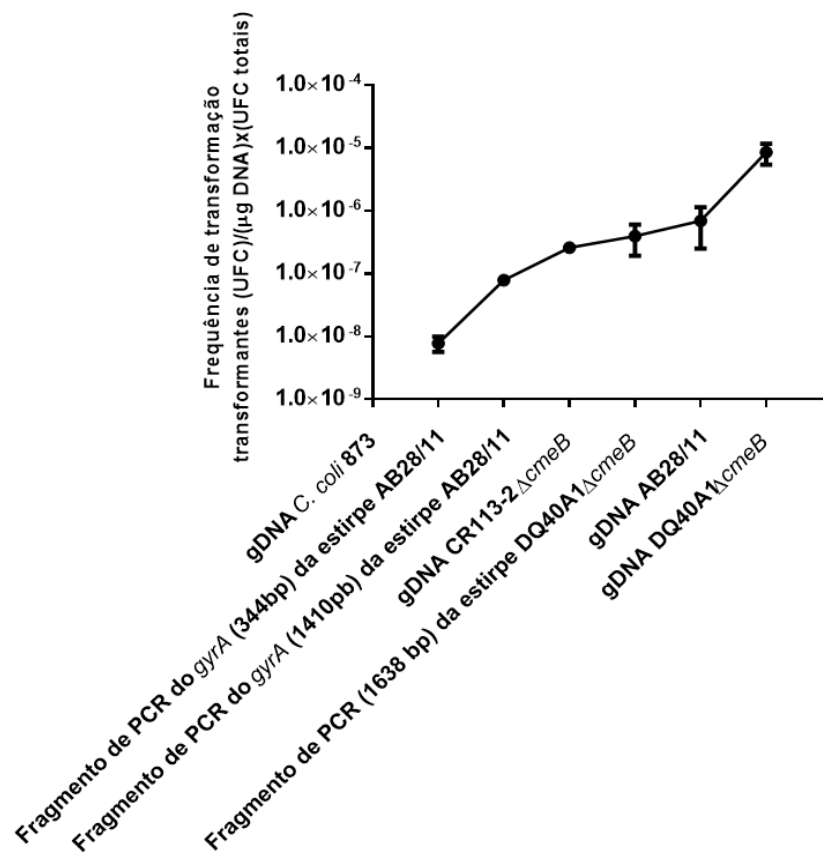


Figura 4.2. Frequência de transformação da estirpe *Arcobacter butzleri* DQ40A1 com material genético de diferentes origens, em sistema bifásico em meio BA a 30°C e atmosfera de microaerofilia. Resultados mostram a média±desvio padrão de três ensaios independentes, para cada tipo de material genético.

Através deste método foi possível verificar que *A. butzleri* se demonstrou naturalmente transformável com material genético proveniente da mesma espécie bacteriana, independentemente do tipo de material genético utilizado. Quando comparando a transformação com os fragmentos de PCR, foi possível constatar que quanto maior é o fragmento utilizado maior é a frequência de transformação obtida.

O tamanho do material genético que se encontra no meio é um dos parâmetros que foi descrito como tendo influência na frequência de transformação natural, para outros microrganismos, sendo exemplos as espécies *Ralstonia solanacearum* e *Xylella fastidiosa* (Coupat et al., 2008; Kung et al., 2013). A existência de homologia entre sequências permite a troca de uma fração das cadeias de DNA do microrganismo com uma das cadeias do material genético incorporado, podendo a diminuição do tamanho de fragmento ser associado a um decréscimo da região homóloga ao DNA da estirpe recetora, e por sua vez à redução da transformação (De Vries et al., 2001). De facto, em *Acinetobacter baylyi* a diminuição das zonas com homologia ao gDNA, nos fragmentos utilizados, demonstrou provocar uma diminuição na frequência de transformação desta bactéria (Simpson et al., 2007). Neste estudo verificou-se que a maior frequência de transformação ($8,49 \times 10^{-6} \pm 5,41 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ (μg DNA x UFC totais)) se obteve quando se utilizou gDNA isogénico da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1Δ*cmeB* como material genético dador comparativamente com os valores obtidos no caso de

utilização de gDNA das estirpes AB28/11 ($7,64 \times 10^{-7} \pm 7,47 \times 10^{-7}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC}$ totais) e CR113-2 $\Delta cmeB$ ($2,59 \times 10^{-7} \pm 5,12 \times 10^{-8}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC}$ totais)). Outro fator que apoia a hipótese de que a redução do tamanho do material genético leva à redução da região homóloga e à ocorrência de uma diminuição da frequência de transformação, são os valores de frequência obtidos entre cada fragmento de PCR e respectivo gDNA. Para os fragmentos de PCR obtidos a partir do gDNA da estirpe AB28/11 foram obtidas frequências de transformação de $7,80 \times 10^{-9} \pm 3,71 \times 10^{-9}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC}$ totais) para o fragmento de 344 pb, e de $7,85 \times 10^{-8} \pm 1,13 \times 10^{-8}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC}$ totais) para o fragmento de 1410 pb, valores inferiores, quando comparando com os obtidos aos do respectivo gDNA ($7,64 \times 10^{-7} \pm 7,47 \times 10^{-7}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC}$ totais)). A influência do tamanho do material genético verifica-se também para o fragmento de PCR de 1638 pb obtido a partir do gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 $\Delta cmeB$, em que foi obtida uma frequência de $3,96 \times 10^{-7} \pm 3,54 \times 10^{-7}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC}$ totais), valor inferior ao obtido quando comparando com o respectivo gDNA ($8,49 \times 10^{-6} \pm 5,41 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC}$ totais)). Os resultados obtidos podem indicar que quanto maior homologia entre as sequências incorporadas e o genoma bacteriano, maior a probabilidade de hibridizar com o genoma bacteriano e conseqüentemente maior é a frequência de transformação obtida. Quando foi utilizado gDNA de uma espécie diferente, como o gDNA da estirpe de *C. coli* 873, contendo uma cassete de resistência à gentamicina, não foi possível obter transformantes, indicando que a transformação natural pode ser específica para a espécie, mas não para a estirpe. Também num trabalho similar realizado para *C. jejuni* foi demonstrado que a adição de concentrações crescentes de gDNA de outra espécie (naquele caso *A. butzleri*), não originou a obtenção de transformantes (Vegge et al., 2012), comportamento similar ao obtido neste estudo para *A. butzleri*.

Outro fator importante a ter em conta nas frequências de transformação obtidas, é a existência de DNases. Em *A. baylyi* tem que existir alguma homologia entre a sequência incorporada e o genoma bacteriano para que o material genético incorporado não seja degradado (Harms et al., 2007). Quando não existe homologia entre as sequências incorporadas e o genoma bacteriano é expectável que haja uma diminuição dos transformantes, o que pode ser explicado pela existência de DNases que por não reconhecerem a sequência incorporada como pertencente ao genoma bacteriano, e assim procedem à sua degradação (Jeltsch, 2003).

Dado que a frequência de transformação mais elevada foi obtida com gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 $\Delta cmeB$, este foi o material genético utilizado para os restantes ensaios de avaliação da transformação.

4.4. Curva de crescimento das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 e DQ40A1 $\Delta cmeB$

Um dos materiais genéticos dadores que foi avaliado foi o gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 $\Delta cmeB$. Esta estirpe possui uma cassete de resistência à canamicina interrompendo o gene *cmeB*. A presença desta cassete de resistência ou a interrupção do gene podem influenciar o

crescimento do microrganismo quando comparado com a estirpe nativa e assim influenciar a frequência de transformação. Assim, houve a necessidade de verificar o efeito da alteração genética no crescimento bacteriano e conseqüentemente na frequência de transformação, com o objetivo de validar a utilização deste material genético para ensaios futuros. O efeito das alterações genéticas no crescimento foi avaliado através da realização de curvas de crescimento da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB* e da respectiva estirpe nativa DQ40A1 em meio de cultura TSB a 30°C e sob uma atmosfera de microaerofilia. O crescimento de ambas as estirpes ocorreu paralelamente e as DO_{620nm} foram registadas ao longo do tempo, encontrando-se as mesmas representadas na figura 4.3.

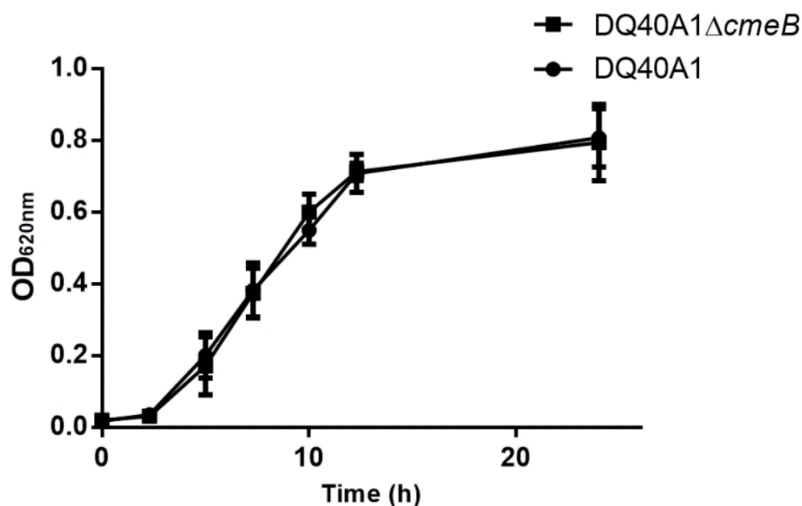


Figura 4.3. Curva de crescimento das estirpes de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 e DQ40A1 Δ *cmeB*. Resultados mostram a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

Por avaliação dos perfis obtidos não foram observadas variações significativas para as curvas de crescimento, indicando que a introdução da cassete de resistência à canamicina não afeta o crescimento. Assim, pode estabelecer-se a utilização do gDNA da estirpe DQ40A1 Δ *cmeB* para ensaios posteriores, uma vez que, quando se compara o crescimento de ambas as estirpes nas mesmas condições, não se verificam alterações no padrão de crescimento.

Apesar de em trabalhos anteriores, como o de Melnyk et al. (2015), se ter verificado que o ganho de resistência pelos microrganismos tem um custo de adaptação associado, uma vez que o ganho de resistência a antibióticos inibe por vezes processos celulares importantes (Melnyk et al., 2015). Tal não se verificou no presente estudo, em que a inserção da cassete que confere resistência à canamicina na estirpe DQ40A1 Δ *cmeB*, não levou alterações no seu crescimento. Também, como reportado por Ferreira et al. (2018), a mutação pontual que confere resistência à ciprofloxacina, não influencia o crescimento de *A. butzleri*, não sendo esta responsável pela menor frequência de transformação observada (Figura 4.2.). A resistência à ciprofloxacina em *A. butzleri* encontra-se normalmente associada a uma mutação pontual C254T na região QRDR do gene *gyrA* (González et al., 2017; Van den Abeele et al., 2016). Isto significa que em determinadas concentrações de antibióticos os transformantes selecionados poderiam não só derivar do processo de transformação natural, como

também de mutações espontâneas que ocorressem. Assim, a utilização do gDNA da estirpe DQ40A1 Δ *cmeB* elimina a probabilidade de a seleção ser feita por ocorrência de mutações espontâneas e garante que os transformantes obtidos, sejam provenientes apenas do processo de transformação natural.

4.5. Curva de saturação de material genético

Com o objetivo de se determinar a partir de que concentração de DNA é atingido o número máximo de transformantes, foi estudada de seguida a influência da concentração de material genético adicionado para transformar a estirpe de *A. butzleri* DQ40A1. Assim, foram testadas várias concentrações de gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB*, sendo o número de transformantes registado em função da concentração de gDNA usado, como representado na figura 4.4.

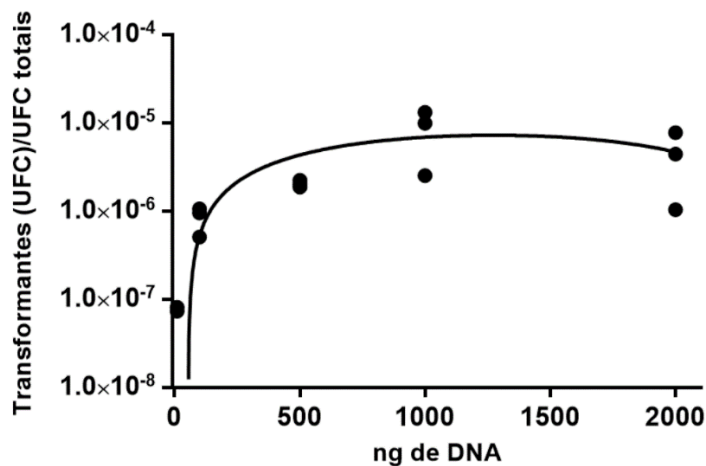


Figura 4.4. Transformação de *Arcobacter butzleri* com concentrações crescentes (10- 2000 ng) de gDNA isogénico proveniente da estirpe de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB*. Resultados mostram a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, para cada concentração de gDNA.

Através da figura 4.4 pode verificar-se que o número de transformantes (UFC)/ UFC totais aumenta com o aumento da concentração de material genético adicionado, sendo atingido um número máximo com a utilização de 1 μ g de gDNA. Esta concentração está de acordo com o que se encontra descrito, para outras bactérias de Gram-negativo como é o caso de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *C. coli* e *C. jejuni* que também necessitam de cerca de 1 μ g de DNA para que seja atingido o maior número de transformantes (Wang et al., 2002; Wang & Taylor, 1990). É possível também observar que mesmo com o aumento da concentração de material genético utilizado, a eficiência de transformação mantém-se, o que indica que a utilização de 1 μ g de gDNA é suficiente para transformar uma porção de células na transformação. Por comparação com outros microrganismos como é o caso de *H. pylori* que necessita de aproximadamente 6 ng de gDNA, *A. butzleri* necessita de uma concentração mais elevada de material genético para que se atinja o número máximo de transformantes. Para *A. calcoaceticus*,

por exemplo são também necessários 1-2 µg de gDNA, para que se atinja a frequência de transformação máxima (Palmen et al., 1993), à semelhança do que acontece para *A. butzleri*. Este resultado permitiu assim concluir que, dependendo do microrganismo que é considerado, a concentração de material genético, para que ocorra transformação, varia significativamente, sendo por isso um parâmetro que deve ser estudado para cada caso.

4.6. Frequência de transformação de acordo com a fase de crescimento

A fase de crescimento para muitas bactérias de Gram-negativo, como por exemplo bactérias do género *Aeromonas*, bem como as espécies *A. baylyi*, *H. influenza*, *H. pylori* e *C. jejuni*, tem influência no processo de transformação natural, sendo um fator variável consoante a bactéria em estudo (Huddleston et al., 2013; Utnes et al., 2015; Baltrus & Guillemin, 2006; Stewart & Carlson, 1986; Vegge et al., 2012). Para o género *Aeromonas*, a competência é desenvolvida no fim da fase estacionária (Huddleston et al., 2013), no entanto para outros microrganismos, tais como *A. vinelandii*, a competência mantém-se apenas na fase exponencial de crescimento, durante um curto período de tempo e em *C. jejuni* a competência desenvolve-se entre as fases exponencial e estacionária de crescimento (Page & Sadoff, 1976; Vegge et al., 2012). Em função do microrganismo que se considera, a obtenção de um maior número de transformantes depende assim da fase de crescimento onde estes se encontram.

Assim, dependendo do microrganismo em estudo, o protocolo de transformação usado deve ser adequado à fase de crescimento do microrganismo, bem como à fase em que é desencadeada a competência. Em qualquer dos casos, o processo de transformação tem que ser adaptado de modo a que a adição do material genético seja realizada na fase de crescimento em que as células se encontram em competência, com o objetivo de obter um maior número de transformantes. A fase de crescimento bem como o estudo cinético, foram assim, considerados dois dos parâmetros para estudo em *A. butzleri*, de modo a avaliar em que fase de crescimento esta bactéria desenvolve competência, bem como averiguar durante quanto tempo esta se mantém.

No protocolo inicialmente testado para sistema bifásico, as células provenientes de um crescimento prévio em placa foram usadas para fazer suspensão em TSB, a sua DO_{620nm} ajustada para obter 5x10⁸ UFC/mL e posteriormente transferidas para tubos contendo 1,5 mL de meio BA e incubadas durante 6 horas antes de lhes ser adicionado o material genético dador. Assim, com o objetivo de avaliar o papel da fase de crescimento na frequência de transformação, foram testados diferentes períodos de incubação antes da adição do gDNA, tendo-se testado 2, 4, 6 e 12 horas de crescimento. Com o objetivo de avaliar a fase de crescimento em que as células se encontravam antes da adição do material genético foram retiradas amostras no inóculo ao longo do tempo, sendo estas transferidas para placas com meio não seletivo para contagem das UFC totais/mL. A frequência de transformação foi calculada para cada período de incubação e os resultados encontram-se apresentados na figura 4.5.

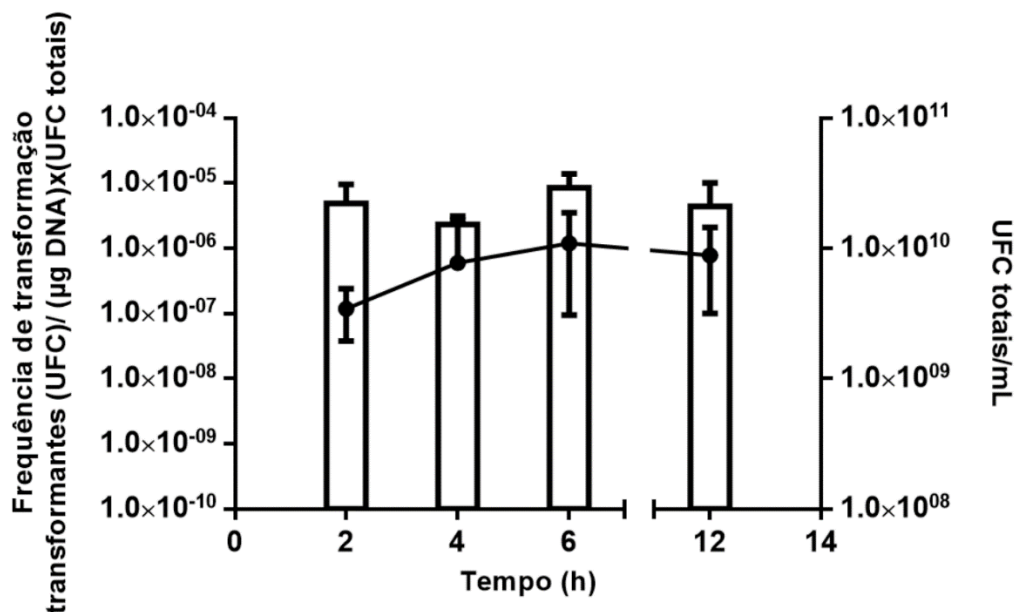


Figura 4.5. Transformação em função da fase de crescimento. A curva representa as UFC totais/mL em função do tempo. As colunas representam a frequência de transformação em função do tempo de incubação prévio à adição de gDNA da estirpe de *Arcobacter butzleri* DQ40A1Δ*cmeB*. Resultados mostram a média ± desvio padrão para cada tempo de incubação de três ensaios independentes.

Observando a figura 4.5 é possível constatar que a frequência de transformação mais elevada ($8,49 \times 10^{-6} \pm 5,41 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ (µgDNA x UFC totais)) é obtida quando as células foram sujeitas a um período de incubação de 6 horas, ao fim das quais foi adicionado o gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1Δ*cmeB*. No entanto é de notar que as frequências de transformação obtidas nos restantes tempos de incubação são semelhantes, sendo às 2 horas obtida uma frequência de transformação de $4,48 \times 10^{-6} \pm 4,72 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ (µgDNA x UFC totais), às 4 h de $2,34 \times 10^{-6} \pm 3,78 \times 10^{-7}$ transformantes (UFC)/ (µgDNA x UFC totais) e às 12 horas de $4,37 \times 10^{-6} \pm 5,71 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ (µgDNA x UFC totais). Os resultados obtidos permitem concluir que *A. butzleri* é naturalmente competente ao longo de todos os tempos estudados. Esta bactéria demonstra assim ser competente desde a fase exponencial até à fase estacionária, sendo obtido um pico de frequência de transformação no início da fase estacionária. Nesta fase, apesar de existirem mais células e menos DNA disponível por cada uma, existe um equilíbrio entre células que se encontram em morte celular e as que se continuam a dividir. Às 12 horas ainda é possível obter transformantes, pois as células que incorporam o material genético, provavelmente um grande número, já se encontra perto da fase de morte celular, ao incorporarem e replicarem, após a morte o material genético contendo o marcador fica disponível para transformar as células ainda existentes (Baltrus & Guillemin, 2006).

4.7. Cinética de transformação

A cinética de transformação é um dos fatores relevantes geralmente avaliado em bactérias de Gram-negativo tais como o género *Campylobacter*, e as espécies *A. calcoaceticus* e *A. actinomycetemcomitans* (Palmen et al., 1993; Vegge et al., 2012; Wang et al., 2002). Este parâmetro

permite avaliar a captura de material genético em função do tempo de exposição ao mesmo, bem como os períodos de incubação em que o microrganismo é naturalmente competente, tal como realizado para *Campylobacter* (Vegge et al., 2012). A captura é avaliada com auxílio à enzima DNase, adicionada a diferentes tempos de incubação. Para tal, inicialmente foi necessário confirmar se a enzima tinha a capacidade de degradar o DNA quando adicionada às células no meio de cultura utilizado no ponto 3.5.3, tendo para isso sido retiradas amostras de: DNA e 100 µg/mL de DNase em água, de 1 µg de DNA, do DNA em meio TSB com 100 µg/mL de DNase e por fim DNA em meio de cultura TSB. O resultado da degradação do DNA foi observado através de uma eletroforese em gel de agarose, encontrando-se os resultados representados na figura 4.6.

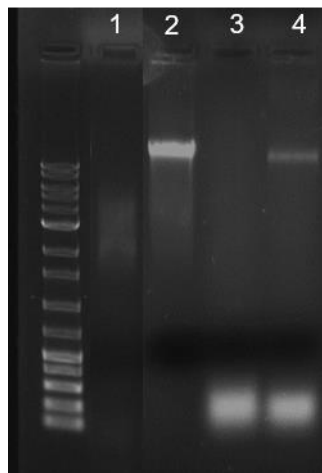


Figura 4.6. Eletroforese em gel de agarose para confirmação da degradação do DNA no meio de cultura utilizado para transformação. (1) DNA e 100 µg/mL DNase; (2) DNA; (3) DNA em meio de cultura juntamente com 100 µg/mL de DNase e (4) DNA em meio de cultura.

Assim, foi possível confirmar através da eletroforese que a enzima tinha a capacidade de degradar o DNA presente no meio de cultura, sendo então estabelecido o seu uso para a avaliação da cinética de transformação. De modo a avaliar o efeito da incorporação do DNA ao longo do tempo por *A. butzleri*, a captura de gDNA foi parada por adição de 100 µg/mL de DNase aos tempos de incubação de 0, 15, 30, 60, 180 e 300 minutos de exposição de *A. butzleri* DQ40A1 ao gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1Δ*cmeB*. Os resultados das frequências de transformação foram registados para cada tempo de incubação em que foi adicionada a enzima, encontrando-se representados na figura 4.7.

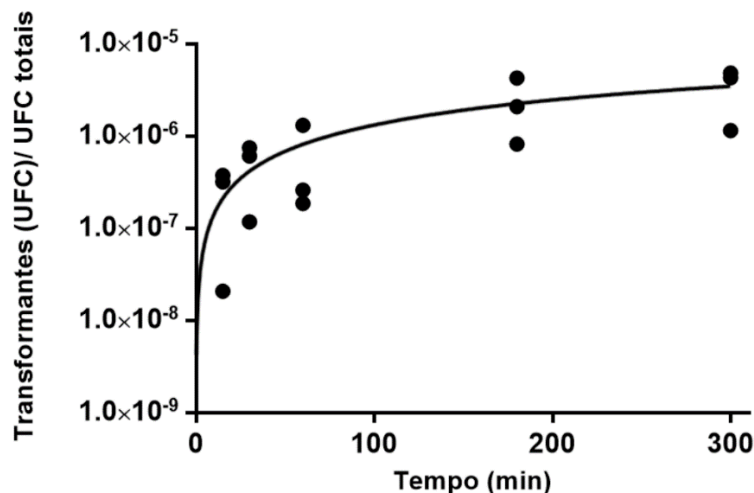


Figura 4.7. Cinética de transformação natural. Transformação com gDNA da estirpe de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB* contendo uma cassete de resistência à canamicina. Captura de DNA terminada pela ação da DNase em diferentes períodos de incubação (0-300 minutos) com o material genético. Resultados correspondem a três ensaios independentes.

Através da figura 4.7 é possível verificar que, a incorporação de material genético ocorre aproximadamente ao fim de 15 minutos de exposição. Pode afirmar-se que em *A. butzleri* a incorporação do material genético é um processo rápido, à semelhança do que acontece para *A. calcoaceticus*, onde os primeiros transformantes são obtidos após 1 minuto de exposição ao material genético (Palmen et al., 1993). É de notar que número de transformantes (UFC)/ UFC totais, aumenta gradualmente ao longo do tempo de exposição ao material genético, à semelhança do que acontece para *Campylobacter* (Vegge et al., 2012) bem como para outras bactérias de Gram-negativo tais como *N. gonorrhoeae* (Sparling, 1966) e *A. calcoaceticus* (Palmen et al., 1993). O máximo de transformantes (UFC)/ UFC totais é obtido após 300 minutos de exposição, tempo que coincide com as 5 horas de incubação com o gDNA no ensaio, porém é possível obter transformantes em todos os períodos de incubação, obtendo-se um nível saturante de transformantes entre 60-180 minutos. O fato da incorporação em *A. butzleri* ser um processo rápido, torna este microrganismo mais susceptível à incorporação de material genético.

4.8. Frequência de transformação na presença de DNA competidor

No meio ambiente, em condições normais de crescimento, os microrganismos crescem em contacto com materiais genéticos que são libertados por outras bactérias, podendo ou não incorporar o mesmo no seu genoma. Como anteriormente observado, *A. butzleri* necessita de uma concentração de gDNA de 1 μ g, para obter o maior número de transformantes. No entanto, em estudos realizados no género *Campylobacter* bem como na espécie *A. actinomycetemcomitans*, verificou-se que a frequência de transformação pode ser afectada pela presença de material genético proveniente de outras espécies (Wang et al., 2002; Wang & Taylor, 1990). Com o objetivo de avaliar se existe competição por gDNA

provenientes de outras espécies afectando a frequência de transformação, as células de *A. butzleri* DQ40A1 foram transformadas com concentrações de 10, 100, 500 e 1000 ng de gDNA de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB*, na presença de 1 μ g de gDNA de *H. pylori* ATCC26695 ou *C. jejuni* NCTC11168. As frequências de transformação obtidas encontram-se registadas na figura 4.8.

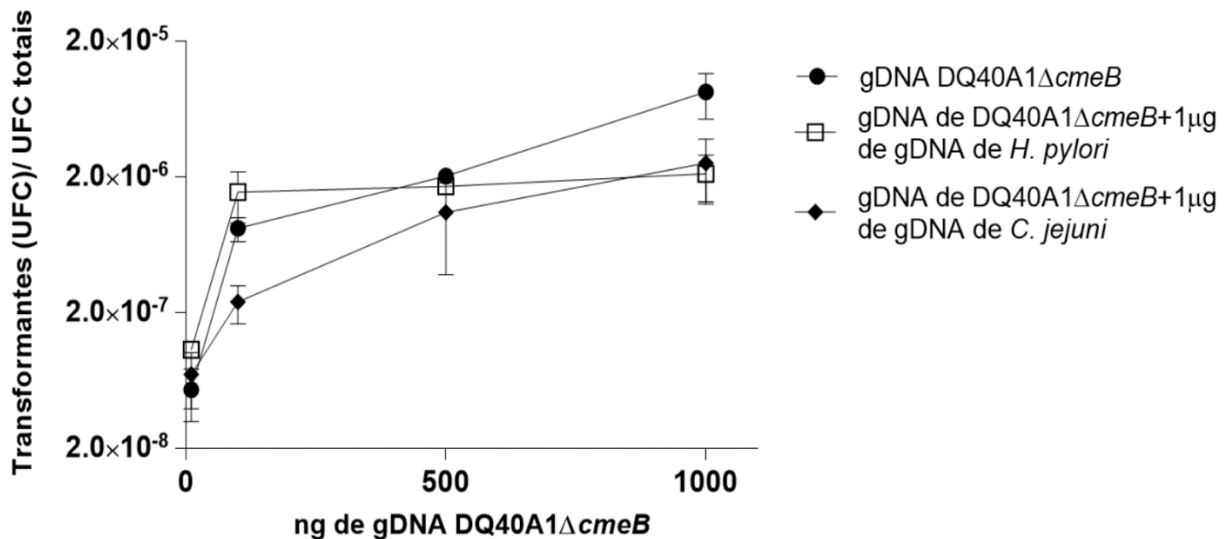


Figura 4.8. Transformação da estirpe de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 com concentrações crescentes (10-1000 ng) de gDNA da estirpe de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB* na • ausência ou na presença de □ 1 μ g de gDNA de *Helicobacter pylori* ou ◆ 1 μ g de gDNA de *Campylobacter jejuni*. A significância estatística foi determinada usando teste ANOVA, sendo considerada significativa para valores de $p < 0,05$. Os resultados mostram a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

Por observação da figura 4.8 é possível notar que numa fase inicial, ao utilizar-se 1 μ g de gDNA de *H. pylori* ou *C. jejuni* e uma concentração de 10 ng de gDNA da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB*, o número de transformantes (UFC)/ UFC totais, é superior ($1,61 \times 10^{-7} \pm 4,65 \times 10^{-9}$ transformantes (UFC)/ UFC totais em *H. pylori* e $1,60 \times 10^{-7} \pm 5,45 \times 10^{-8}$ transformantes (UFC)/ UFC totais em *C. jejuni*) ao obtido apenas utilizando 10 ng de gDNA da estirpe DQ40A1 Δ *cmeB* ($5,45 \times 10^{-8} \pm 3,96 \times 10^{-8}$ transformantes (UFC)/ UFC totais), no entanto não sendo estas diferenças significativas ($p > 0,05$). Com o aumento da concentração de material genético da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 Δ *cmeB* e mantendo-se constante a utilização de 1 μ g do gDNA das outras espécies, verifica-se que ocorre uma pequena diminuição da curva associada à frequência de transformação. Quando se utiliza 1 μ g de gDNA de outras espécies e se mantém uma concentração de 100 ng de gDNA da estirpe DQ40A1 Δ *cmeB*, a frequência de transformação diminui significativamente (de $8,39 \times 10^{-7} \pm 2,94 \times 10^{-7}$ transformantes (UFC)/ UFC totais, para $4,77 \times 10^{-7} \pm 1,25 \times 10^{-7}$ transformantes (UFC)/ UFC totais quando o ensaio é feito em competição com o gDNA de *C. jejuni* ($p = 0,03$). No entanto quando se aumenta a concentração para 1 μ g de gDNA da estirpe DQ40A1 Δ *cmeB* foi obtido $8,49 \times 10^{-6} \pm 5,41 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ UFC totais, mas mantendo 1 μ g de gDNA de outras espécies, ocorre uma pequena diminuição deste valor, sendo de $3,17 \times 10^{-6} \pm 1,38 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ UFC totais, para *H. pylori* e de $3,82 \times 10^{-6} \pm 2,21 \times 10^{-6}$

transformantes (UFC)/ UFC totais, em *C. jejuni*, no entanto sem significado estatístico ($p > 0,05$). Assim, apesar de haver uma diminuição significativa do número de transformantes quando da utilização de gDNA de *C. jejuni*, não é possível afirmar que a transformação é inibida pela adição de DNA exógeno assim, os resultados obtidos não permitem tirar conclusões de que *A. butzleri* tenha mecanismos de diferenciação de material genético da sua espécie ou sequências de reconhecimento específicas. Pode concluir-se, no entanto, que *A. butzleri* favorece a captação de material genético da sua espécie, podendo tal como o descrito para outros microrganismos como *H. influenzae*, ter um mecanismo que diferencia o material genético de *Arcobacter* do de outras espécies (Goodgal, 1982).

4.9. Coculturas bacterianas

A troca de informação genética, através da HGT é um fator importante, que permite que determinantes de resistência sejam transmitidos e se disseminem (Van Hoek et al., 2011). É assim importante avaliar se existe troca de material genético entre coculturas bacterianas, durante o crescimento de *A. butzleri*. Como observado anteriormente a incorporação de determinantes de resistência é possível, desde que haja material genético contendo os mesmos disponível no meio extracelular. No entanto, estudos realizados para outras bactérias, tais como *C. jejuni* demonstraram que este microrganismo é capaz de transferir determinantes de resistência em coculturas sem a adição de material genético no meio de cultura (Wilson et al., 2003). Esta transferência de determinantes de resistência, pode ocorrer através de processos de HGT, permitindo que surjam bactérias multirresistentes, tendo como consequência um aumento do nível de adaptação do microrganismo (Berglund, 2015). Em *A. butzleri*, no entanto não se sabe se este é capaz de transferir material genético para outras estirpes. Com o intuito de verificar se *A. butzleri*, tem a capacidade de transferir gDNA contendo determinantes de resistência entre elas quando em cocultura, as estirpes de *A. butzleri* 851 e DQ40A1 Δ *cmeB*, foram colocadas a crescer em cocultura à semelhança do que foi realizado para *C. jejuni* (Jeon et al., 2008). Assim a transferência de material genético ao longo do tempo foi avaliada nos períodos de incubação de 0, 3, 8 e 24 horas, retirando-se amostras a cada um dos tubos dos respectivos tempos de incubação. As amostras retiradas foram plaqueadas em placas de meio BA contendo canamicina (30 μ g/mL), ciprofloxacina (4 μ g/mL) ou ambos os antibióticos. Por fim registaram-se o número de colónias resistentes a cada antibiótico bem como as colónias resistentes a ambos. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 4.9.

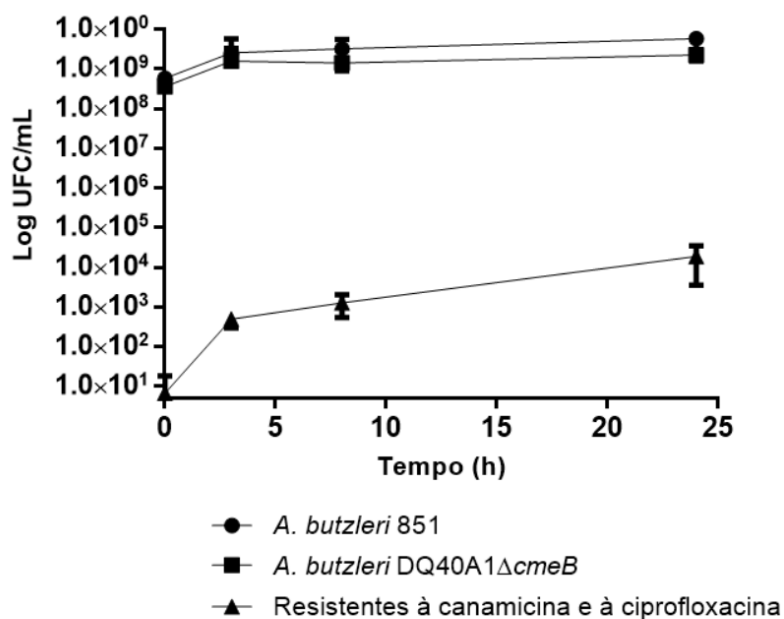


Figura 4.9. Transferência de determinantes de resistência em coculturas de *Arcobacter butzleri* usando as estirpes de *Arcobacter butzleri* 851 (com resistência à ciprofloxacina associada a uma mutação na região QRDR do gene *gyrA*) e DQ40A1Δ*cmeB* (com uma cassete de resistência à canamicina), ao longo dos períodos de incubação de 0, 3, 8 e 24 horas. Resultados mostram a média ± desvio padrão de três ensaios independentes.

No ensaio de coculturas realizado, a estirpe de *A. butzleri* contendo a mutação pontual que confere resistência à ciprofloxacina, bem como a estirpe que contém a cassete de resistência à canamicina foram colocadas a crescer em cocultura. A transformação em cocultura permite não só avaliar a captação, integração e expressão do material genético, tal como ocorre pela utilização de DNA purificado, mas também a liberação de DNA durante o crescimento (Wilson et al., 2003). Com este ensaio foi possível observar o aparecimento de colônias resistentes a ambos os antibióticos, ao fim de aproximadamente 3 horas de incubação. Por outro lado verifica-se que a concentração de colônias resistentes a cada um dos antibióticos individualmente se mantém constante ao longo do tempo. O aumento de colônias transformadas em cocultura pode ser o resultado da constante liberação de DNA no meio por liberação do mesmo por células em crescimento ou por lise celular, de forma similar ao que acontece em *C. jejuni* (Jeon et al., 2008; Wilson et al., 2003).

No entanto, apesar do número de transformantes aumentar ao longo do tempo, verificando-se que ocorre HGT e considerando-se que este é o principal processo pelo qual ocorre transferência de genes, não é possível afirmar que este seja o único mecanismo envolvido na transferência de informação genética. Neste caso, a HGT pode ser promovida através dos mecanismos de conjugação e/ou transformação natural (Von Wintersdorff et al., 2016). No entanto, é possível afirmar que em *A. butzleri* a transferência de material genético entre estirpes pode ser dependente dos processos de transformação natural.

Capítulo 5- Conclusão

A. butzleri é uma bactéria patogénica emergente, amplamente distribuída em diversos ambientes. A elevada distribuição desta bactéria tem vindo a ser associada a uma elevada diversidade genética, a qual poderá contribuir para a sua elevada capacidade adaptativa. Um dos mecanismos associados à diversidade genética é a HGT, processo que contribui para a troca de informação genética intercelular, e que pode ser possibilitado pelos mecanismos de conjugação, transdução e transformação natural. A transformação natural é dentro destes considerado o processo mais provável para explicar como é que os microrganismos adquirem material genético de outras estirpes/espécies. Dado que o processo de transformação natural não se encontra estudado para *A. butzleri*, este trabalho teve como principal objetivo analisar se esta bactéria é naturalmente transformável, bem como estudar o efeito de diversos parâmetros na transformação natural desta bactéria.

Assim, neste trabalho foi possível transformar *A. butzleri* tendo-se obtido uma frequência de transformação máxima de 10^{-5} transformantes por célula recetora, obtidos após 5 dias de incubação. De entre as cinco estirpes testadas quatro demonstraram ser naturalmente transformáveis, com a frequência de transformação variando entre $2,13 \times 10^{-8}$ e $2,08 \times 10^{-5}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC totais}$), quando usando uma metodologia de transformação em meio sólido.

No geral, as melhores condições de transformação verificaram-se à temperatura de 30°C e sob uma atmosfera de microaerofilia, onde a frequência de transformação mais elevada, usando o sistema bifásico, foi obtida no início da fase estacionária, com a utilização de $1 \mu\text{g}$ de gDNA isogénico, tendo-se obtido $8,49 \times 10^{-6} \pm 5,41 \times 10^{-6}$ transformantes (UFC)/ ($\mu\text{g DNA} \times \text{UFC totais}$). Esta concentração de gDNA correspondeu à concentração saturante para obtenção do número máximo de transformantes (UFC)/ UCF totais. Os resultados deste estudo permitiram ainda constatar que *A. butzleri* é naturalmente competente desde a fase exponencial à estacionária, onde o processo de captura ocorre antes ou aproximadamente 15 minutos após a exposição ao material genético dador.

Por fim, foi avaliado se ocorria a troca de material genético entre estirpes de *A. butzleri* em cocultura. O aparecimento de mutantes resistentes a ambos os antibióticos utilizados ao fim de aproximadamente 3 horas de incubação, valida a hipótese de ocorrer HGT, podendo esta ser dependente do processo de transformação natural.

Em suma, este estudo veio trazer conhecimento acerca do processo de transformação natural em *A. butzleri* apontando ser este processo uma forma de transferência horizontal de genes entre estirpes desta espécie. O trabalho apresentado pode ainda permitir estabelecer um protocolo que permita melhorar a investigação molecular associada a este microrganismo, permitido por exemplo, a criação de mutantes. No entanto, mais estudos deverão ser realizados de modo a melhorar o conhecimento acerca da contribuição do processo de transformação natural para a diversidade e adaptação genética desta bactéria.

Capítulo 6- Perspetivas futuras

Considerando o estudo efetuado relativo à transformação natural de *A. butzleri* bem como a relevância deste processo para o aumento da diversidade genética neste microrganismo, mais estudos deverão ser realizados com o objetivo de avaliar outros parâmetros com papel relevante na transferência horizontal de genes via transformação natural. Assim, seria importante em trabalhos futuros:

- Identificar quais os nutrientes que afetam a transformação natural de *A. butzleri*, bem como analisar do efeito da sua escassez, e de condições limitantes de crescimento;
- Analisar o efeito da degradação do material genético dador na transformação natural;
- Determinar durante quanto tempo *A. butzleri* se mantém competente após a entrada na fase estacionária;
- Estudar o processo de transformação natural em coculturas, utilizando *A. butzleri* com outras espécies bacterianas do mesmo género;
- Avaliar o efeito da presença de DNA competidor de estirpes de *A. butzleri* ou de espécies do mesmo género ou mesmo de outras espécies na captura de material genético;
- Estudar a existência das proteínas de competência envolvidas no processo de transformação natural em *A. butzleri*, bem como estudar a sua função no mecanismo de captura e incorporação de material genético.

Referências Bibliográficas

- Arguello, E., Otto, C. C., Mead, P., & Babady, N. E. (2015). Bacteremia caused by *Arcobacter butzleri* in an immunocompromised host. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(4), 1448–1451.
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., & Rehman, Y. (2017). Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation. *Frontiers in Microbiology*, *8*(1), 6–10.
- Atabay, H. I., & Aydin, F. (2001). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in Applied Microbiology*, *33*(6), 430–433.
- Bacon, D. J., Alm, R., Burr, D. H., Hu, L., Kopecko, D. J., Ewing, C. P., Guerry, P. (2000). Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity*, *68*(8), 4384–4390.
- Baltrus, D. A., & Guillemin, K. (2006). Multiple phases of competence occur during the *Helicobacter pylori* growth cycle. *FEMS Microbiology Letters*, *255*(1), 148–155.
- Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection Ecology & Epidemiology*, *5*(1), 28564.
- Bertani, G., & Baresi, L. (1987). Genetic transformation in the methanogen *Methanococcus voltae* PS. *Journal of Bacteriology*, *169*(6), 2730–2738.
- Binet, R., Létoffé, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P., & Wandersman, C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. *Gene*, *192*(1), 7–11.
- Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology*, *26*(21), R1126–R1130.
- Boer, E., Tilburg, J. J. H. C., Woodward, D. L., Lior, H., & Johnson, W. M. (1996). A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *Letters in Applied Microbiology*, *23*(1), 64–66.
- Bräutigam, M., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1997). Evidence for natural transformation of *Bacillus subtilis* in foodstuffs. *FEMS Microbiology Letters*, *155*(1), 93–98.
- Carbone, M., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., Midiri, A., & Fera, M. T. (2003). Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio* spp. isolates to epithelial cells in vitro. *Food Microbiology*, *20*(5), 611–616.
- Carlson, C. A., Pierson, L. S., Rosen, J. J., & Ingraham, J. L. (1983). *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *Journal of Bacteriology*, *153*(1), 93–99.
- Cervenka, L. (2007). Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. *Critical Reviews in Microbiology*, *33*(2), 101–108.
- Chen, I., Christie, P. J., & Dubnau, D. (2005). The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria. *Science*, *310*(5753), 1456–1460.
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(3), 241–249.
- Chen, I., & Gotschlich, E. C. (2001). ComE, a Competence Protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-Binding Activity. *Journal of Bacteriology*, *183*(10), 3160–3168.
- Chung, Y. S., & Dubnau, D. (1998). All seven *comG* open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *180*(1), 41–45.
- Claverys, J.-P., & Havarstein, L. S. (2002). Extracellular-peptide control of competence for genetic

- transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7(1), d1798-814.
- Claverys, J.-P., & Martin, B. (2003). Bacterial 'competence' genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends in Microbiology*, 11(4), 161–165.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P., & Figueras, M. J. (2009). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6), 1391–1396.
- Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–192.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1635–1640.
- Collado, L., Levican, A., Perez, J., & Figueras, M. J. (2011). *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9), 2155–2161.
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*, 304(5668), 242–248.
- Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X., & Bertolla, F. (2008). Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 14–24.
- Danner, D. B., Deich, R. A., Sisco, K. L., & Smith, H. O. (1980). An eleven-base-pair sequence determines the specificity of DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Gene*, 11(3–4), 311–318.
- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., & Houf, K. (2011). *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 356–361.
- de Vries, J., Meier, P., & Wackernagel, W. (2001). The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiology Letters*, 195(2), 211–215.
- de Vries, J., & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2094–2099.
- Dempsey, L. A., & Dubnau, D. A. (1989). Identification of plasmid and *Bacillus subtilis* chromosomal recombination sites used for pE194 integration. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2856–2865.
- Diéguez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T., & Romalde, J. L. (2017). *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1327–1332.
- Diéguez, A. L., Pérez-Cataluña, A., Figueras, M. J., & Romalde, J. L. (2018). *Arcobacter haliotis* Tanaka et al. 2017 is a later heterotypic synonym of *Arcobacter lekithochrous* Diéguez et al. 2017. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2851–2854.
- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, A., Theron, J., & Brözel, V. S. (2004). The occurrence of *campylobacters* in water sources in South Africa. *Water Research*, 38(10), 2589–2595.

- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), 414–424.
- Domingues, S., Harms, K., Fricke, W. F., Johnsen, P. J., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012). Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002837.
- Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W., & Alam, M. (2005). *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1271–1277.
- Doudah, L., de Zutter, L., Bare, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., Abelle, A.-M., Houf, K. (2012). Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 735–741.
- Draskovic, I., & Dubnau, D. (2004). Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Molecular Microbiology*, 55(3), 881–896.
- Duarte, A., Santos, A., Manageiro, V., Martins, A., Fraqueza, M. J., Caniça, M., Domingues, F. C., Oleastro, M. (2014). Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(4), 306–313.
- Duarte, A. (2016). Natural compounds as new antibacterials to control *Campylobacter* spp. Tese de Doutoramento em Biomedicina. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 169 pp
- Dubnau, D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 5(1), 395–424.
- Dubnau, D. (1999). DNA Uptake in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 53(1), 217.
- Dubnau, D., & Chen, I. (2003). DNA transport during transformation. *Frontiers in Bioscience*, 8(6), 544–556.
- Dubnau, D., & Provvedi, R. (2000). Internalizing DNA. *Research in Microbiology*, 151(6), 475–480.
- Ehrlich, S. D., Bierne, H., D'Alençon, E., Vilette, D., Petranovic, M., Noirot, P., & Michel, B. (1993). Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene*, 135(1–2), 161–166.
- Elkins, C., Thomas, C. E., Seifert, H. S., & Sparling, P. F. (1991). Species-specific uptake of DNA by Gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *Journal of Bacteriology*, 173(12), 3911–3913.
- Ellis, W., Neill, S., O'Brien, J., & Hanna, J. (1978). Isolation of *spirillum*-like organisms from pig fetuses. *Veterinary Record*, 102(5), 106–106.
- Engberg, J., On, S. L. W., Harrington, C. S., & Gerner-Smidt, P. (2000). Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 286–291.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
- Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D., & Pennisi, M. G. (2009). Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1661–1666.

- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., La Camera, E., Blandino, G., & Carbone, M. (2003). In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(5), 488–491.
- Fernández, H., Krause, S., & Paz Villanueva, M. (2004). *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: communication of two cases with chronic diarrhea. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(3), 216–218.
- Ferreira, S., Correia, D. R., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2018). *Arcobacter butzleri* Ciprofloxacin Resistance: Point Mutations in DNA Gyrase A and Role on Fitness Cost. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 915–922.
- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2013). Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 82–88.
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2017). Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. in a dairy plant. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1019–1026.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2014). Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*, 76, 19–25.
- Ferreira, S., Queiroz, J. a., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2015). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*. A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 364–383.
- Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J., & Yustes, C. (2011). *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 105–109.
- Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I., & Yustes, C. (2011). *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(6), 414–418.
- Figueras, M. J., Levican, A., Pujol, I., Ballester, F., Rabada Quilez, M. J., & Gomez-Bertomeu, F. (2014). A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. *New Microbes and New Infections*, 2(2), 31–37.
- Figueras, M. J., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Levican, A., & Collado, L. (2017). ‘*Arcobacter porcinus*’ sp. nov., a novel *Arcobacter* species uncovered by *Arcobacter thereius*. *New Microbes and New Infections*, 15 (1), 104–106.
- Fitzmaurice, W. P., Benjamin, R. C., Huang, P. C., & Scocca, J. J. (1984). Characterization of recognition sites on bacteriophage HPIc1 DNA which interact with the DNA uptake system of *Haemophilus influenzae* Rd. *Gene*, 31(1–3), 187–196.
- Fong, T.-T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy, S. L., & Rose, J. B. (2007). Massive Microbiological Groundwater Contamination Associated with a Waterborne Outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environmental Health Perspectives*, 115(6), 856–864.
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378.
- Frigaard, N. U., & Bryant, D. A. (2001). Chromosomal gene inactivation in the green sulfur bacterium

- Chlorobium tepidum* by natural transformation. *Applied and Environmental Microbiology Environ Microbiol*, 67(6), 2538–2544.
- Frischer, M. E., Thurmond, J. M., & Paul, J. H. (1993). Factors affecting competence in a high frequency of transformation marine *Vibrio*. *Journal of General Microbiology*, 139(4), 753–761.
- Georgiadou, M., Castagnini, M., Karimova, G., Ladant, D., & Pelicic, V. (2012). Large-scale study of the interactions between proteins involved in type IV pilus biology in *Neisseria meningitidis*: characterization of a subcomplex involved in pilus assembly. *Molecular Microbiology*, 84(5), 857–873.
- Gogarten, J. P., Doolittle, W. F., & Lawrence, J. G. (2002). Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2226–2238.
- González, A., Bayas Morejón, I. F., & Ferrús, M. A. (2017). Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiology*, 65(8), 279–283.
- González, A., & Ferrús, M. A. (2011). Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 311–314.
- Goodgal, S. H. (1982). DNA Uptake in *Haemophilus* Transformation. *Annual Review of Genetics*, 16(1), 169–192.
- Gugliandolo, C., Irrera, G. P., Lentini, V., & Maugeri, T. L. (2008). Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 56(3), 600–606.
- Hahn, J., Maier, B., & Haijema, B. J. (2015). Transformation Proteins and DNA Uptake Localize to the Cell Poles in *Bacillus subtilis*, 122(1), 59–71.
- Hamoen, L. W., Venema, G., & Kuipers, O. P. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149(1), 9–17.
- Harms, K., Schön, V., Kickstein, E., & Wackernagel, W. (2007). The RecJ DNase strongly suppresses genomic integration of short but not long foreign DNA fragments by homology-facilitated illegitimate recombination during transformation of *Acinetobacter baylyi*. *Molecular Microbiology*, 64(3), 691–702.
- Hausdorf, L., Fröhling, A., Schlüter, O., & Klocke, M. (2011). Analysis of the bacterial community within carrot wash water. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(5), 447–452.
- Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., Schuter, O., Klocke, M. (2013). Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(4), 235–243.
- Ho, H., Lipman, L., & Gaastra, W. (2006). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!. *Veterinary Microbiology*, 115(1), 1–13.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Hendriks, H. G. C. J. M., Tooten, P. C. J., Ultee, T., & Gaastra, W. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 51–58.

- Ho, H. T. K., Lipman, L. J., Wösten, M. M. S. M., van Asten, A. J. M., & Gaastra, W. (2008). *Arcobacter* spp. possess two very short flagellins of which FlaA is essential for motility. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *53*(1), 85–95.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., & Haas, R. (2001). Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, *41*(2), 379–391.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Henke, G., & Haas, R. (1998). Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: Identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Molecular Microbiology*, *28*(5), 1027–1038.
- Holden, N. J., & Gally, D. L. (2004). Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *Journal of Medical Microbiology*, *53*(7), 585–593.
- Houf, K., De Zutter, L., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2002). Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing. *Journal of Food Protection*, *65*(8), 1233–1239.
- Houf, K., De Zutter, L., Verbeke, B., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2003). Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, *66*(3), 364–9.
- Houf, K., Devriese, L. a, Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.-P., van Hoof, J., & Vandamme, P. (2004). Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *10*(3), 243–247.
- Houf, K., On, S. L. W., & Coenye, T Mast, J Van, H Vandamme, P. (2005). *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(2), 713–717.
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S., & Vandamme, P. (2009). *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(10), 2599–2604.
- Houf, K., & Stephan, R. (2007). Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. *Journal of Microbiological Methods*, *68*(2), 408–413.
- Hsu, T.-T. D., & Lee, J. (2015). Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses and Public Health*, *62*(8), 579–589.
- Hsueh, P. R., Teng, L. J., Yang, P. C., Wang, S. K., Chang, S. C., Ho, S. W., Hsieh, W.-C., Luh, K. T. (1997). Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(2), 489–91.
- Hua, J.-S., Zheng, P.-Y., Fong, T. K., Khin, M. M., & Bow, H. (1998). *Helicobacter pylori* acquisition of metronidazole resistance by natural transformation *in vitro*. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *4*(5), 385–387.
- Huddleston, J. R., Brokaw, J. M., Zak, J. C., & Jeter, R. M. (2013). Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer among environmental *Aeromonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*(4), 224–234.
- ICMSF. (2002). Microbiological testing in food safety management. International Commission on

- Microbiological Specifications for Foods. New York, NY.
- Inamine, G. S., & Dubnau, D. (1995). ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3045–3051.
- Israel, D. A., Lou, A. S., & Blaser, M. J. (2000). Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiology Letters*, 186(2), 275–280.
- Jeltsch, A. (2003). Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria: A new function for restriction/modification systems? *Gene*, 317(1–2), 13–16.
- Jeon, B., Muraoka, W., Sahin, O., & Zhang, Q. (2008). Role of Cj1211 in natural transformation and transfer of antibiotic resistance determinants in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2699–2708.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., & Håvarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158(10), 767–778.
- Juan, P. A., Attaiech, L., & Charpentier, X. (2015). Natural transformation occurs independently of the essential actin-like MreB cytoskeleton in *Legionella pneumophila*. *Scientific Reports*, 5(August), 1–13.
- Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., Abe, M., Katsube, Y., Mikami, T. (2004). Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 303–308.
- Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäuser, U., Glocker, E., Alter, T., & Götz, G. (2013). Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 583–590.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., & Wachsmuth, I. K. (1991). *Campylobacter butzleri* Sp. Nov Isolated from Humans and Animals with Diarrheal Illness. *J Clin Microbiol*, 29(2), 376–385.
- Kim, H. M., Hwang, C. Y., & Cho, B. C. (2010). *Arcobacter marinus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3), 531–536.
- Klemm, P., & Schembri, M. A. (2000). Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 290(1), 27–35.
- Klemm, P., Vejborg, R. M., & Hancock, V. (2010). Prevention of bacterial adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 451–459.
- Koster, M., Bitter, W., & Tommassen, J. (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(4–5), 325–331.
- Krause-Gruszczynska, M., Van Alphen, L. B., Oyarzabal, O. a., Alter, T., Hänel, I., Schliephake, A., König, W., Putten, J. P. M., Konkel, M. E., Backert, S. (2007). Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 274(1), 9–16.
- Kung, S. H., Retchless, A. C., Kwan, J. Y., & Almeida, R. P. P. (2013). Effects of DNA Size on Transformation and Recombination Efficiencies in *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1712–1717.

- Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C., Davis, J. P. (2013). An Outbreak of Foodborne Illness Among Attendees of a Wedding Reception in Wisconsin Likely Caused by *Arcobacter butzleri*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(3), 250–255.
- Lehner, A., Tasara, T., & Stephan, R. (2005). Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 127–135.
- Leighton, T. L., Buensuceso, R. N. C., Howell, P. L., & Burrows, L. L. (2015). Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4148–4163.
- Lerner, J., Brumberger, V., & Preac-Mursic, V. (1994). Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 13(8), 660–662.
- Levican, A., Alkeskas, A., Gunter, C., Forsythe, S. J., & Figueras, M. J. (2013). Adherence to and Invasion of Human Intestinal Cells by *Arcobacter* Species and Their Virulence Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4951–4957.
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2012). *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 133–138.
- Levican, A., Collado, L., & Figueras, M. J. (2013). *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(1), 22–7.
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martínez-Murcia, A., Collado, L., & Figueras, M. J. (2015). *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(1), 30–35.
- Littmann, J., Buyx, A., & Cars, O. (2015). Antibiotic resistance: An ethical challenge. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(4), 359–361.
- Liu, X., Liu, L., Wang, Y., Wang, X., Ma, Y., & Li, Y. (2014). The study on the factors affecting transformation efficiency of *E. coli* competent cells. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(3), 679–684.
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58(3), 563–602.
- Macfadyen, L. P., Chen, D., Vo, H. C., Liao, D., Sinotte, R., & Redfield, R. J. (2001). Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Molecular Microbiology*, 40(3), 700–707.
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine (United Kingdom)*, 45(10), 622–628.
- Maugeri, T. L., Carbone, M., Fera, M. T., Irrera, G. P., & Gugliandolo, C. (2004). Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 354–361.
- Maughan, H., & Redfield, R. J. (2009). Extensive variation in natural competence in *Haemophilus*

- influenzae*. *Evolution*, 63(7), 1852–1866.
- McClung, C. R., Patriquin, D. G., & David, R. E. (1983). *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3), 605–612.
- Melnyk, A. H., Wong, A., & Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 8(3), 273–283.
- Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., Mandrell, R. E. (2007). The Complete Genome Sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS One*, 2(12), e1358.
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Alonso, L., Ferrús, M. a, Hernández, M., & Hernández, J. (2003). Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1181–1186.
- Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Nimsuphan, B., Nagai, A., Kozawa, K., Nakajima, T., Mikami, T., Kimura, H. (2004). Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand. *Microbiology and Immunology*, 48(7), 527–533.
- Murphy, T. F., Brauer, A. L. (2011). Expression of urease by *Haemophilus influenzae* during human respiratory tract infection and role in survival in an acid environment. *BMC Microbiology*, 11(1), 183.
- Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., & Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genetics*, 36(7), 760–766.
- Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257(5073), 1064–1073.
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D., & Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*, 6(1–2), 37–53.
- Normark, B. H., & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91–106.
- On, S. L. W., Stacey, A., & Smyth, J. (1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *Journal of Infection*, 31(3), 225–227.
- Öngör, H., Çetinkaya, B., Açıık, M. N., & Atabay, H. I. (2004). Investigation of *arcobacters* in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 339–344.
- Ottow, J. C. (1975). Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annual Review of Microbiology*, 29, 79–108.
- Page, W. J., & Sadoff, H. L. (1976). Physiological Factors Affecting Transformation of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 125(3), 1080–1087.
- Palmen, R., Vosman, B., Buijsman, P., Breek, C. K., & Hellingwerf, K. J. (1993b). Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of General Microbiology*, 139(2), 295–305.
- Park, S., Jung, Y. T., Kim, S., & Yoon, J. H. (2016). *Arcobacter acticola* sp. nov., isolated from seawater on the East Sea in South Korea. *Journal of Microbiology*, 54(10), 655–659.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., & Figueras, M. J. (2018). *Arcobacter canalis* sp. nov., isolated

- from a water canal contaminated with urban sewage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4), 1258–1264.
- Pontioli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T. M., & Monier, J. M. (2009). Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3314–3322.
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., & Tanner, S. A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1), 31–35.
- Rivas, L., Fegan, N., & Vanderlinde, P. (2004). Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 31–41.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1993). Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm--adsorption, DNAase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Ecology*, 2(3), 171–181.
- Saier, M. H. (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *Journal of Membrane Biology*, 214(1–2), 75–90.
- Sansonetti, P. J. (1993). Bacterial pathogens, from adherence to invasion: comparative strategies. *Medical Microbiology and Immunology*, 182(5), 223–232.
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2013). *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(12), 4619–4625.
- Shah, N., Bandara, A. B., Sandal, I., & Inzana, T. J. (2014). Natural competence in *Histophilus somni* strain 2336. *Veterinary Microbiology*, 173(3–4), 371–378.
- Sikorski, J., Teschner, N., & Wackernagel, W. (2002). Highly Different Levels of Natural Transformation Are Associated with Genomic Subgroups within a Local Population of *Pseudomonas stutzeri* from Soil. *Society*, 68(2), 865–873.
- Silva, A. L. (2017). A Contribuição de Bombas de Efluxo para a Resistência em *Arcobacter butzleri*. Tese de Mestrado em Biotecnologia. Universidade da Beira Interior. Covilhã. 85 pp
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: A review. *Frontiers in Microbiology*, 2(1664–302X), 1–12.
- Simpson, D. J., Dawson, L. F., Fry, J. C., Rogers, H. J., & Day, M. J. (2007). Influence of flanking homology and insert size on the transformation frequency of *Acinetobacter baylyi* BD413. *Environmental Biosafety Research*, 6(1–2), 55–69.
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., & Dooley, J. S. G. (2006). Under the microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), 7–14.
- Solomon, J. M., & Grossman, A. D. (1996). Who's competent and when: Regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics*, 12(4), 150–155.
- Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., & Harrison, M. A. (2007). Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *International Journal of*

- Antimicrobial Agents*, 29(4), 451–455.
- Sparling, P. F. (1966). Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J Bacteriol*, 92(5), 1364–71.
- Stewart, G. J., & Carlson, C. A. (1986). The Biology of Natural Transformation. *Annual Review of Microbiology*, 40(1), 211–231.
- Stoeva, K., & Ward, F. B. (2006). Genome mapping of *Arcobacter butzleri*. *FEMS Microbiology Letters*, 256(2), 290–297.
- Tanaka, R., Cleenwerck, I., Mizutani, Y., Ichihara, S., Bossier, P., & Vandamme, P. (2017). *Arcobacter haliotis* sp. nov., isolated from abalone species *Haliotis gigantea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 3050–3056.
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721.
- Ünver, A., Atabay, H. I., Şahin, M., & Çelebi, Ö. (2013). Antimicrobial susceptibilities of various *Arcobacter* species. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 43(4), 548–552.
- Utnes, A. L. G., Sørum, V., Hülter, N., Primicerio, R., Hegstad, J., Kloos, J., Nielsen, K. M., Johnsen, P. J. (2015). Growth phase-specific evolutionary benefits of natural transformation in *Acinetobacter baylyi*. *ISME Journal*, 9(10), 2221–2231.
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Vanlaere, E., & Houf, K. (2016). Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(5), 1241–1244.
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 2(203), 1–27.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), 88–103.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J.-P., Lior, H., Lauwers, S. (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2335–2337.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Hommez, J. (1992). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 344–356.
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranet, S., Butzler, J. (2004). *Arcobacter* Species in Humans, 10(10), 1863–1867.
- Vegge, C. S., Brøndsted, L., Ligowska-Marzeta, M., & Ingmer, H. (2012). Natural Transformation of *Campylobacter jejuni* Occurs Beyond Limits of Growth. *PLoS ONE*, 7(9), 1–10.
- Vicente-Martins, S., Oleastro, M., Domingues, F. C., & Ferreira, S. (2018). *Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance. *Food Control*, 85, 107–112.
- Wang, J., Hu, W., Lux, R., He, X., Li, Y., & Shi, W. (2011). Natural transformation of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2122–2132.

- Wang, Y., Goodman, S. D., Redfield, R. J., & Chen, C. (2002). Natural Transformation and DNA Uptake Signal Sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 184(13), 3442–3449.
- Wang, Y., & Taylor, D. E. (1990). Natural Transformation in *Campylobacter* Species. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 949–955.
- Whiteduck-Leveillee, K., Whiteduck-Leveillee, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Khan, I. U. H. (2015). *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(8), 2709–2716.
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Khan, I. U. H. (2016). Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(2), 93–99.
- Wilson, D. L., Bell, J. A., Young, V. B., Wilder, S. R., Mansfield, L. S., & Linz, J. E. (2003). Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture. *Microbiology*, 149(12), 3603–3615.
- Woo, P. C. Y., Chong, K. T. K., Leung, K. W., Que, T. L., & Yuen, K. Y. (2001). Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 40(3), 125–127.
- World Health Organization (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014. World Health Organization, France, 125.
- Wybo, I., Breynaert, J., Lauwers, S., & Houf, K. (2004). Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a Patient with Chronic Diarrhea, 42(4), 1851–1853.
- Young, K. T., Davis, L. M., & DiRita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: Molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 665–679.
- Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu, S., & Zhang, X. H. (2016). *Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the south pacific Gyre. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 542–547.

Anexos

Anexo 1: Alinhamento do fragmento de 344 pb com o gene da *gryA* pertencente à estirpe de *Arcobacter butzleri* AB28/11 (resistente à ciprofloxacina) com o fragmento de *Arcobacter butzleri* RM4018 (NC_009850.1) (suscetível à ciprofloxacina).

Ab28/11	cggattaaagccagttcatagaagaatTTTtatatgcaatgcacgatttaagtattacttc	60
RM4018	TGGATTAAAGCCAGTTCATAGAAGAATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTC	60

Ab28/11	aaaatctgcctataaaaaatctgcaagaattgTTggagatgTTattggtaaatacacc	120
RM4018	AAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAGAATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCC	120

Ab28/11	tcatggagata ttt cagtttatgatgcacttGtaagaatggcacaaaatttctctttaag	180
RM4018	TCATGGAGATA CTT CAGTTTATGATGCACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAG	180
	***** *****	
Ab28/11	agctccacttGttgatggacaaggaaactTTTggttctatcgatggtgataatgcagcggc	240
RM4018	AGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAACTTTGGTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGC	240

Ab28/11	tatgagatatacagaagctagaatgacaagaattgctgaagaagttctaagagatttaga	300
RM4018	TATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTAGA	300

Ab28/11	taaagatacagtaaactTTgTtccaaattatgatgatac gatga	344
RM4018	TAAAGATACAGTAAACTTTGTTCCAAATTATGATGATACGATGA	344

Anexo 2: Abstract e certificado de participação no XIII annual CICS-UBI Symposium



XIII Annual CICS-UBI Symposium

5th and 6th July



NATURAL TRANSFORMATION IN *ARCOBACTER BUTZLERI*

Bonifácio M.¹, Oleastro M.², Domingues F.³, Ferreira S.³

¹FCT-UNL- Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;

²National Reference Laboratory for Gastrointestinal infections, Department of Infectious Diseases, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal;

³CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

ABSTRACT

Arcobacter butzleri is, within the genus *Arcobacter*, the most often species associated with diarrheal diseases in humans, as well as, with bacteraemia in a few cases. *A. butzleri* demonstrates a high genetic diversity that likely contributes to its high adaptive capacity to different environments. One of the mechanisms contributing to this genetic diversity may be the horizontal gene transfer through natural transformation, which is characterized by the absorption, incorporation and functional expression of exogenous DNA that can occur under natural growth conditions. Aiming to clarify if *A. butzleri* is naturally competent for transformation and which factors can influence this process, we tested different transformation procedures, by using exogenous DNA containing antibiotic resistance markers. We verify that *A. butzleri* is naturally transformable with a maximum frequency of 10^{-5} transformants per recipient cell, obtained after five days of incubation. The optimal conditions for transformation was found in exponential growing phase by using 1µg of homologous DNA, at 30°C and under a microaerophilic atmosphere. Also, four strains among the tested strains demonstrated to be natural competent for transformation. In conclusion, horizontal gene transfer mediated by natural transformation likely contributes to the genetic diversity of *A. butzleri*.

Keywords: Natural transformation, *Arcobacter butzleri*, Horizontal gene transfer.



XIII Annual CICS-UBI Symposium

I herewith certify that Marina Bonifácio has participated
as speaker in the XIII Annual CICS-UBI Symposium, which was held in Covilhã, the 5th
and 6th July 2018.

Fani Suse
The Organizing Committee

