

ANNA GABRIELLA GUIMARÃES OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO POR *Parabacteroides distasonis*:
PESQUISA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS TIPO BACTERIOCINA**

**Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte
2013**

Anna Gabriella Guimarães Oliveira

Expressão de antagonismo por *Parabacteroides distasonis*: pesquisa, purificação
e caracterização de substâncias tipo bacteriocina

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia.

Orientador: Luiz de Macêdo Farias

Coorientadoras: Paula Prazeres Magalhães

Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios

Departamento Microbiologia

Instituto de Ciências biológicas

UFMG

Belo Horizonte

2013

043

Oliveira, Anna Gabriella Guimarães.

Expressão de antagonismo por Parabacteroides distasonis: pesquisa, purificação e caracterização de substâncias tipo bacteriocina [manuscrito] / Anna Gabriella Guimarães Oliveira. – 2013.

127 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Luiz de Macêdo Farias. Co-orientadoras: Paula Prazeres Magalhães, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Parabacteroides distasonis - Teses. 2. Inibidores químicos - Teses. 3. Antagonismo. 4. Bacteriocinas - Teses. 5. Microbiologia - Teses. I. Farias, Luiz de Macêdo. II. Magalhães, Paula Prazeres. III. Carvalho, Maria Auxiliadora Roque de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576.8

COLABORAÇÃO

Prof. Jacques Robert Nicoli

Departamento de Microbiologia

Prof. Marcelo Matos Santoro

Jamil Silvano Oliveira

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Lorena Mendes Maia

Amanda Maria Pereira Borges

Bolsistas Iniciação Científica

Departamento de Microbiologia

ICB

UFMG

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

À minha família, principalmente à minha avó Lourdes (*in memorian*) e a meu avô Joca(*in memorian*), e a todos que me ajudaram na execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais um trabalho realizado e pela presença constante, em todas as minhas realizações.

Aos meus pais, Patrícia e Paulo, e meu avô Joca, pelo amor, carinho, ensinamentos e apoio incondicional.

Ao meu orientador Luiz, pela oportunidade, por me aceitar em seu Laboratório de portas abertas, pela confiança, apoio, incentivo e pelo auxílio na execução do trabalho.

À minha coorientadora Paula, pela dedicação dispensada em todas as ocasiões que precisei e pela inestimável participação em todas as etapas desta pesquisa.

À minha coorientadora Dodora, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho, me auxiliando na revisão bibliográfica, sempre disposta a procurar artigos sobre o tema do trabalho.

Ao Jamil, pela sua inestimável ajuda, pela sua disposição de sempre ajudar, tirar dúvidas e se empenhar, dedicando muito do seu tempo precioso para a tentativa de purificação da nossa proteína.

Ao José Sérgio, Luzia, Carol e Nati (apoio técnico), imprescindíveis para o bom funcionamento do Laboratório e, conseqüentemente, para a realização dos experimentos.

À Simone, pela colaboração nos experimentos, sempre disposta a incentivar, além das conversas e da sua amizade.

Ao Jacques Nicoli, pela colaboração no projeto, pela ajuda, sempre disposto a tirar minhas dúvidas e a me auxiliar no uso da câmara anaeróbica.

Às amigas do laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Pati, Dani e Jaque, pelo bom convívio que tivemos, pela solidariedade, ajuda nos experimentos e elaboração de protocolos, discussões teóricas e conversas diárias.

À Lorena e à Amanda, que ajudaram tanto nos experimentos, sem as quais eu não conseguiria desenvolver o trabalho, além do companheirismo e amizade demonstrados.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, João Fernando, Marcela, Augusto, Renata, Hanocho, Raiane, Juliana, Gabriel, Yam, Tatá, Doris, Taís, Rafa e Lu, pela convivência tranquila e maravilhosa.

Aos colegas do laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, Rafa, Samir, Mário, Bárbara, Karine, Tássia, Leo, Flaviano, Ariane, Bianca e Éricka, pela amizade, conversas e empréstimos de materiais, sempre dispostos a me ajudar.

Às meninas da República Três é Demais, pelo companheirismo, carinho, paciência, por me proporcionarem momentos ótimos na nossa casa.

Às minhas amigas queridas Ló, Dé, Marcela, Aline, Fernanda, Rafa, Petra, Lívia, Sarita, Mel, Naya, Pri, Joyce, Yana, Marina, Sarinha, Renatinha, Dri, Dani, Elisa, amigas para a vida toda, por me ensinar o real significado da amizade e companheirismo.

À UFMG e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, professores e funcionários, pelos ensinamentos e apoio, principalmente ao Douglas e à Patrícia.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG e à PRPq/UFMG, pelos auxílios financeiros concedidos.

É loucura...

Desistir de todos os esforços porque um deles fracassou...

*Jogar fora todas as chances de acertar porque uma tentativa
não deu certo...*

Nunca cometeremos estas loucuras se lembrarmos que...

há sempre um outro caminho;

há sempre uma outra chance;

e uma nova força dentro de nós e em Deus.

SUMÁRIO

	p
LISTA DE QUADRO	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O GÊNERO <i>Parabacteroides</i>	20
1.1.1 Características gerais	20
1.1.2 Classificação taxonômica	21
1.1.3 Papel na microbiota intestinal	22
1.1.4 Presença na microbiota intestinal de aves	26
1.1.5 Patogenicidade e fatores de virulência	28
1.2 BACTERIOCINAS	30
1.2.1 Aspectos conceituais	30
1.2.2 Bacteriocinas produzidas por Archaea	31
1.2.3 Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas	32
1.2.4 Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas	34
1.2.5 Bacteriocinas produzidas por <i>Parabacteroides</i> e <i>Bacteroides</i>	37
1.2.6 Purificação de bacteriocinas	38
1.2.7 Aplicação de bacteriocinas	40
2 JUSTIFICATIVA	42

3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	AMOSTRAS MICROBIANAS	45
4.2	PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA	48
4.3	DETECÇÃO DE FATORES DE INTERFERÊNCIA	49
4.3.1	Bacteriófagos	49
4.3.2	Ácidos graxos	49
4.3.3	Clorofórmio	50
4.3.4	H ₂ O ₂	50
4.4	EXTRAÇÃO PROTEICA	50
4.5	TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES OBTIDAS	51
4.6	DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES ATIVAS	52
4.7	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA AMOSTRA PRODUTORA	53
4.8	CARACTERIZAÇÃO DE C50	54
4.8.1	Temperatura	54
4.8.2	pH	54
4.8.3	Enzimas proteolíticas	55
4.8.4	Solventes orgânicos	56
4.9	ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DE C50	56
4.9.1	CIM	56
4.9.2	CBM	57
4.10	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ATIVO – CROMATOGRAFIA	58
4.11	SDS-PAGE	59

4.12	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	59
5	RESULTADOS	60
5.1	PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA	60
5.2	AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO DA AMOSTRA PRODUTORA	64
5.3	FATORES DE INTERFERÊNCIA	64
5.3.1	Bacteriófagos	64
5.3.2	Ácidos graxos	64
5.3.3	Clorofórmio	67
5.3.4	H ₂ O ₂	67
5.4	EXTRAÇÃO PROTEICA - TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES OBTIDAS	67
5.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA AMOSTRA PRODUTORA	68
5.6	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA	70
5.6.1	Influência da temperatura	70
5.6.2	Influência do ph	70
5.6.3	Influência de enzimas proteolíticas	70
5.6.4	Influência de solventes orgânicos	72
5.7	ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DE C50: DETERMINAÇÃO DA CIM E DA CBM	72
5.8	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO C50	72
5.9	SDS-PAGE	77
5.10	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA	86
6	DISCUSSÃO	90
7	SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	101
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE QUADRO

p

Quadro 1.	Amostras reveladoras utilizadas para a pesquisa da atividade antagonista de amostras de <i>Parabacteroides distasonis</i> isoladas de frango de corte pelo método da sobrecamada.	46
-----------	---	----

x

LISTA DE TABELAS

p

Tabela 1.	Titulação dos extratos proteicos extracelular e intracelulares de <i>Parabacteroides distasonis</i> P15 ativos contra <i>P. distasonis</i> ATCC 1295.	68
Tabela 2.	Influência de diferentes tratamentos sobre a estabilidade de C50 [fração intracelular precipitada com 50% de $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$].	71
Tabela 3.	CIM e CBM de C50 (Amostra produtora: <i>Parabacteroides distasonis</i> P15, amostra reveladora: <i>P. distasonis</i> ATCC 1295).	73
Tabela 4.	Titulação da atividade antagonista e dosagem proteica das frações ativas originadas das etapas de cromatografia. Amostra produtora: <i>Parabacteroides distasonis</i> P15, amostra reveladora: <i>P. distasonis</i> ATCC 1295.	83
Tabela 5.	Íons detectados nas frações 27 a 29 oriundas da cromatografia de fase reversa por meio de espectrometria de massas. Amostra produtora: <i>Parabacteroides distasonis</i> P15.	86

LISTA DE FIGURAS

p

- Figura 1. Árvore filogenética do gênero *Parabacteroides* e táxons relacionados. A árvore foi construída usando o método *neighbourjoining* baseado na sequência do rDNA 16S. Os números nas ramificações indicam a porcentagem dos valores de *bootstrap* (1000 réplicas). Entre parênteses, os números de acesso no *GenBank* (SAKAMOTO & BENNO, 2006). 23
- Figura 2. Atividade isoantagonista de amostras de *Parabacteroides distasonis* isoladas de frango de corte. Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Amostras produtoras: P15 e P25, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 61
- Figura 3. Espectro de atividade antagonista (heteroantagonismo e isoantagonismo) de 78 amostras de *Parabacteroides distasonis* isoladas de frangos de corte. Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. 62
- Figura 4. Atividade antagonista de amostras de *Parabacteroides distasonis* (1 a 78) isoladas de frangos de corte contra 200 amostras reveladoras [amostras teste, *Bacteroides* isolados de frango e amostras de referência (bactérias Gram negativas, Gram positivas e leveduras)]. Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, tempo e atmosfera adequados para cada reveladora. 63
- Figura 5. Atividade heteroantagonista da amostra de *Parabacteroides distasonis* P15, isolada de frango de corte. Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Amostra reveladora: *Bacteroides fragilis* isolada de paciente com infecção intra-abdominal. 65

- Figura 6. Testes para pesquisa de fatores de interferência. Avaliação da atividade de: a) bacteriófagos, b) ácidos graxos, c) clorofórmio e d) H_2O_2 . Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 66
- Figura 7. Titulação de C50. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. Meio de cultivo BHI-S, incubação a 37 °C, sob diferentes condições. a) 24 h e b) 48 h de incubação, c) estresse por H_2O_2 , d) cultivo na presença da amostra reveladora inativada, e) estresse oxidativo. 69
- Figura 8. Determinação da CIM de C50 (título em UA/mL). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. CN, controle negativo; CP, controle positivo. 74
- Figura 9. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações a) 1, 2, 3 e 4 e b) 17, 18, 19 e 20 resultantes da cromatografia de troca iônica do extrato C50. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 75
- Figura 10. Perfil cromatográfico de troca iônica da fração C50 (fração intracelular precipitada com 50% de $(Na_4)_2SO_4$) produzida por *P. distasonis* P15, utilizando coluna Mono-QTM, acoplada em sistema de FPLC. Sensibilidade 2,0, leitura a 280 nm. Volume das frações: 2,0 mL. Para a determinação da unidade arbitrária (UA/mL), foi utilizada como reveladora da atividade antagonista a amostra *P. distasonis* ATCC 1945. 76

- Figura 11. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações 2 a 5 resultantes da cromatografia de gel filtração. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 78
- Figura 12. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações 12 a 18 resultantes da cromatografia de gel filtração. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 79
- Figura 13. Perfil cromatográfico de gel filtração dos *pools* a) 1 (frações 1 a 4) e b) 2 (frações 17 a 20) oriundos da cromatografia de troca iônica, utilizando coluna de Superose 12 acoplada a sistema de FPLC. Sensibilidade 2,0, leitura 280 nm. Volume das frações 1,5 mL. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 80
- Figura 14. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações 27 a 29 resultantes da cromatografia de fase reversa. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 81
- Figura 15. Perfil cromatográfico de fase reversa do *pool* 3 (frações 2 a 5) oriundo da cromatografia de gel filtração, utilizando coluna C18 acoplada a sistema de HPLC. Leitura a 280 nm. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. 82
- Figura 16. Etapas de purificação da(s) substância(s) antagonista(s) presente(s) no extrato C50 da amostra *Parabacteroides distasonis* P15: origem das frações e constituição dos *pools*. 84

- Figura 17. SDS-PAGE dos *pools* a) 1 (frações 1 a 4 da cromatografia de troca iônica, b) 3 (frações 2 a 5 da cromatografia de gel filtração) e c) 5 (frações 27 a 29 da cromatografia de fase reversa). Marcador de massa molecular pré-corado 10-260 kDa (Spectra multicolor broad range protein ladder). 85
- Figura 18. Espectro de massa proveniente da fração 27 oriunda da cromatografia de fase reversa. Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15. 87
- Figura 19. Espectro de massa proveniente da fração 28 oriunda da cromatografia de fase reversa. Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15. 88
- Figura 20. Espectro de massa proveniente da fração 29 oriunda da cromatografia de fase reversa. Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15. 89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAL: Bactérias do ácido láctico

BHI: *Brain Heart Infusion*

BHIA: *Brain Heart Infusion* Ágar

BHIA-S: *Brain Heart Infusion* Ágar suplementado

BHI-S: *Brain Heart Infusion* suplementado

C30: Extrato proteico intracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 30%

C50: Extrato proteico intracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 50%

C80: Extrato proteico intracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 80%

CBM: Concentração bactericida mínima

CIM: Concentração inibitória mínima

FPLC: *Fast performance liquid chromatography*

GRAS: *Generally recognized as safe*

HPLC: *High performance liquid chromatography*

MALDI: *Matrix assisted laser desorption/ionization*

pH: Potencial hidrogeniônico

rDNA: DNA ribossomal

S30: Extrato proteico extracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 30%

S50: Extrato proteico extracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 50%

S80: Extrato proteico extracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 80%

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*

TFA: *Trifluoroacetic acid*

TOF: *Time-of-flight*

Tris-HCl: *Tris hydrochloride*

UA: Unidades arbitrárias de atividade antibacteriana

UFC: Unidade formadora de colônia

RESUMO

Parabacteroides distasonis é considerado membro da microbiota indígena de seres humanos e outros animais e tem sido associado à etiopatogenia de diversas doenças infecciosas. Bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de natureza proteica sintetizadas por uma ampla gama de bactérias, que exercem papel relevante nas relações ecológicas entre bactérias e apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica. A presente investigação teve como objetivo avaliar a expressão de substâncias antagonistas tipo bacteriocina por *P. distasonis* e caracterizar uma destas substâncias. Foram incluídas no estudo 78 amostras de bactérias isoladas de espécimes fecais de frangos de corte. Foi detectada a expressão de antagonismo por 50% das amostras, sendo observados heteroantagonismo, isoantagonismo e autoantagonismo. Uma das amostras, selecionada para as etapas subsequentes do estudo, foi submetida à extração proteica. Detectou-se elevação do título de atividade do extrato intracelular precipitado com sulfato de amônio à saturação de 50% (C50) após estresse oxidativo. C50 foi inativado por proteases e altas temperaturas e manteve-se ativo após exposição a solventes orgânicos e uma ampla faixa de valores de pH. A CIM e CBM de C50 indicou atividade bacteriostática contra *P. distasonis* ATCC 1295. O extrato foi purificado por etapas sucessivas de cromatografia e os dados relativos a SDS-PAGE e espectrometria de massas indicaram a detecção de substância antagonista com massa molecular de cerca de 7 kDa. Em conjunto, os resultados sugerem a purificação de um peptídeo com espectro de ação relativamente amplo, possivelmente relevante do ponto de vista ecológico e potencialmente aplicável na prática médica.

Palavras-chave: *Parabacteroides distasonis*, antagonismo, bacteriocina

ABSTRACT

Parabacteroides distasonis is considered a member of the indigenous microbiota of humans and other animals and has been associated with the etiopathogenesis of several infectious diseases. Bacteriocins are proteinaceous antimicrobial substances synthesized by a wide range of bacteria that play an essential role in the ecological relationships between bacteria and exhibit a great potential for biotechnological applications. We addressed the production of bacteriocin-like antagonistic substances by *P. distasonis* and the characterization of one of the substances. A total of 78 isolates obtained from broiler feces were included in the study as test strains. We detected the expression of antagonism by 50% of *P. distasonis* strains; heteroantagonism, isoantagonism, and autoantagonism were observed. One of the producer strains selected for further steps was submitted to protein extraction. Oxidative stress have led to an increased antagonistic activity of the intracellular fraction precipitated at 50% ammonium sulfate (C50). C50 was inactivated by proteases and high temperatures and kept active after exposure to organic solvents and a wide pH range. MIC and MBC values demonstrated that C50 acts as a bacteriostatic agent against *P. distasonis* ATCC 1295. C50 was submitted to sequential steps of chromatography. Data originated from SDS-PAGE and mass spectrometry showed an antagonistic substance of about 7 kDa. Taken together our results indicate the detection of a peptide that exhibits a relatively wide spectrum of activity that possibly plays a relevant ecological role and shows a potential practical application.

Keywords: *Parabacteroides distasonis*, antagonism, bacteriocin

1 INTRODUÇÃO

5 1.1 O GÊNERO *Parabacteroides*

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

10 O gênero *Parabacteroides* está, atualmente, incluído na divisão Bacteroidetes, classe Bacteroidia, ordem Bacteroidales, família Bacteroidaceae. A família alberga, também, o gênero *Bacteroides*, do qual, anteriormente, faziam parte os organismos hoje classificados como *Parabacteroides* (KRIEGER *et al.*, 2011).

Os membros do gênero *Parabacteroides* são bastonetes Gram negativos,
15 não formadores de esporos, pleomórficos, imóveis e bile-resistentes. São anaeróbios obrigatórios, apresentam metabolismo quimiorganotrófico e fermentam carboidratos, como a sacarose, produzindo, principalmente, succinato e acetato (SAKAMOTO & BENNO, 2006). Apresentam a habilidade de sintetizar enzimas relacionadas à degradação de diferentes tipos de mucinas e
20 polissacarídeos, como a neuraminidase (ou sialidase) e glicosidases, dentre outras (WEXLER, 2007).

Parabacteroides, com destaque, *Parabacteroides distasonis*, fazem parte da microbiota indígena da cavidade oral e dos tratos respiratório, intestinal e urogenital de seres humanos, sendo encontrados também em outros mamíferos,
25 como primatas não humanos (AVILA-CAMPOS *et al.*, 1990), ratos (SMITH *et al.*, 2005), cães (MIDDELBOSS *et al.*, 2010), suínos (LESER *et al.*, 2002), ruminantes (TAJIMA *et al.*, 1999; LENG *et al.*, 2010), aves (ZHU *et al.*, 2002; SCUPHAM *et al.*, 2008; MATSUI *et al.*, 2010) e insetos (SCHMITT-WAGNER *et al.*, 2003). O grupo é reconhecido, juntamente com o gênero *Bacteroides*, como os anaeróbios
30 obrigatórios predominantes no cólon de seres humanos e de outros animais, desempenhando papel importante para o hospedeiro (WEXLER, 2007).

Embora o ecossistema intestinal contenha uma grande variedade de substratos, os requerimentos nutricionais das espécies de *Parabacteroides* são mínimos. Os organismos se multiplicam em meios contendo carboidratos, amônia, hemina, vitamina B12, sais inorgânicos e agentes redutores (HOLDEMAN *et al.*, 1984; SALYERS, 1984). São aerotolerantes, podendo sobreviver à exposição ao ar por períodos prolongados, devido à presença de enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, que conferem a eles alta resistência à oxidação (TALLY *et al.*, 1977; SALYERS, 1984; BAUGHN & MALAMY, 2004).

10

1.1.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Durante as últimas décadas, a taxonomia de *Bacteroides* foi extensamente revisada e sofreu grandes alterações. Atualmente, o gênero está limitado a espécies do grupo *Bacteroides fragilis* (SONG *et al.*, 2004). Muitas das espécies clinicamente relevantes, anteriormente classificadas como *Bacteroides*, foram transferidas para outros gêneros, como *Porphyromonas* (SHAH & COLLINS, 1988) e *Prevotella* (SHAH & COLLINS, 1990), que incluem especialmente amostras produtoras de pigmento negro, *Dichelobacter* (DEWHIRST *et al.*, 1990), *Dialister* (MOORE & MOORE, 1994), *Tannerella* (SAKAMOTO *et al.*, 2002) e *Alistipes* (RAUTIO *et al.*, 2003).

A possibilidade do uso de sequenciamento do rDNA 16S para análise filogenética tem levado a várias mudanças, como a adição de diversas espécies de *Bacteroides* ao grupo *B. fragilis*, que apresenta, atualmente, mais de 20 espécies, dentre as quais *Bacteroides nordii*, *Bacteroides salyersae*, *Bacteroides massiliensis*, *Bacteroides plebeius*, *Bacteroides corola*, *Bacteroides fingoldii*, *Bacteroides dorei* e *Bacteroides intestinalis*, isoladas de seres humanos (SONG *et al.*, 2004; FENNER *et al.*, 2005; KITAHARA *et al.*, 2005; BAKIR *et al.*, 2006), e *Bacteroides barnesiae*, *Bacteroides salanitronis* e *Bacteroides gallinarum*, isoladas do ceco de galinhas (LAN *et al.*, 2006). O grupo reúne espécies com conteúdo G+C de 40-48%, que apresentam grande capacidade fermentativa e são

fenotípica e genotipicamente semelhantes à espécie *B. fragilis* (SONG *et al.*, 2004).

O gênero *Parabacteroides* foi proposto por SAKAMOTO & BENNO (2006) para reclassificação de três espécies de *Bacteroides*, *Bacteroides distasonis*,
5 *Bacteroides goldsteinii* e *Bacteroides merdae*, com base no sequenciamento do rDNA 16S (FIG. 1). Posteriormente, foram adicionadas as espécies *Parabacteroides johnsonii* (SAKAMOTO *et al.*, 2007), *Parabacteroides gordonii* (SAKAMOTO *et al.*, 2009) e, mais recentemente, *Parabacteroides chartae*, diferentemente das demais, uma espécie isolada do ambiente, de águas
10 residuais de uma fábrica de papel (TAN *et al.*, 2012).

Como características diferenciais do gênero em relação a *Bacteroides*, destacam-se conteúdo G+C de 43-46%, predominância das menaquinonas MK-10 e MK-11 como quinonas respiratórias e presença de ácidos graxos de cadeia longa não hidroxilados na membrana plasmática (SAKAMOTO
15 & BENNO, 2006).

1.1.3 PAPEL NA MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal é constituída por uma mistura dinâmica de microrganismos, que varia, qualitativa e quantitativamente, ao longo do intestino. Fatores genéticos e fisiológicos, ambiente e dieta, entre outros, influenciam a composição desta microbiota, constituída por espécies autóctones, ou seja,
20 permanentes, e alóctones, espécies transitórias que são adquiridas de fonte externa (ZOETENDAL *et al.*, 2004).

A microbiota intestinal desempenha papel relevante na saúde do hospedeiro. Como exemplo, constitui barreira contra a colonização por patógenos alóctones e autóctones oportunistas, pela produção de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, competição por nutrientes e por sítios de adesão;
30 age no metabolismo, realizando funções como fermentação, produção de energia, síntese de vitamina K e digestão; estimula o desenvolvimento do sistema imune; e

auxilia no peristaltismo e na renovação das células epiteliais (HOOPER *et al.*, 2012; OTTMAN *et al.*, 2012).

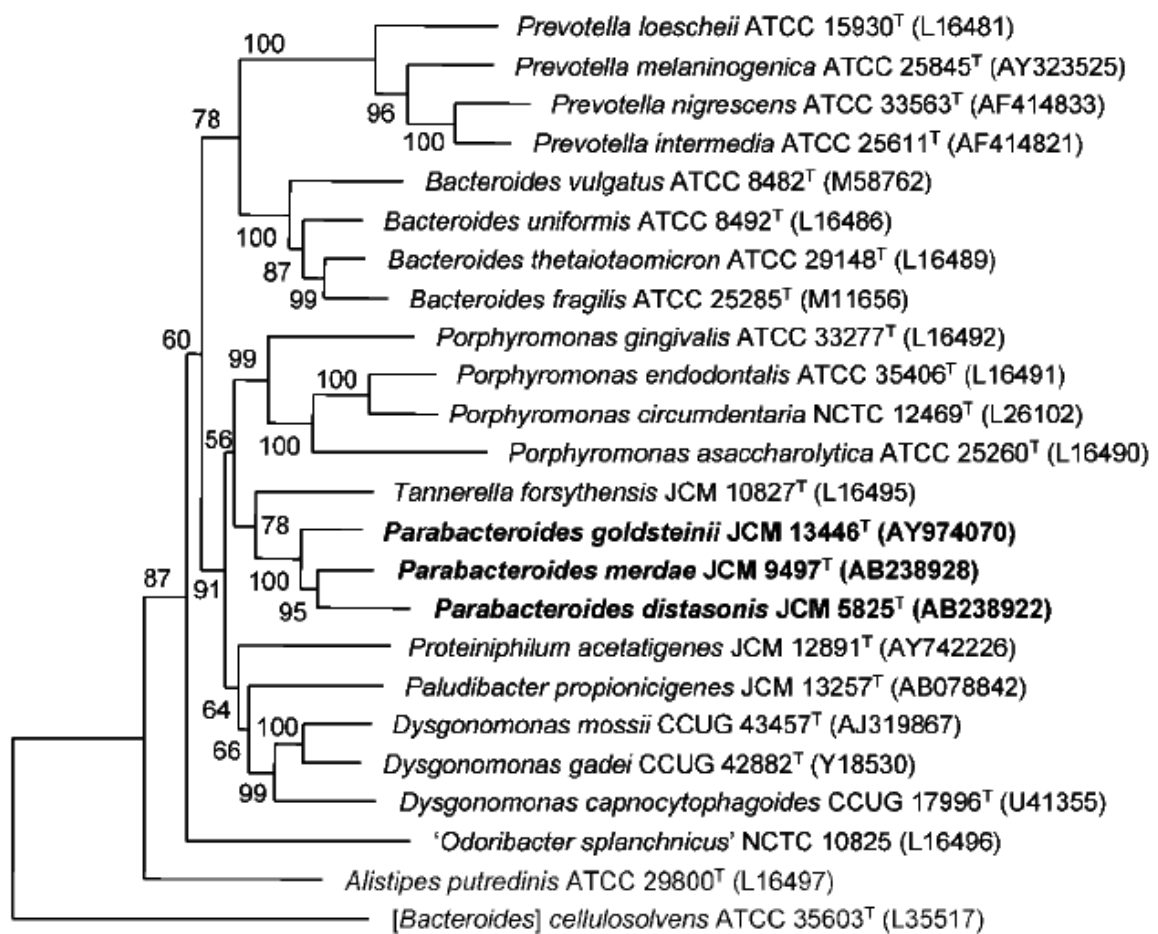


Figura 1. Árvore filogenética do gênero *Parabacteroides* e táxons relacionados. A árvore foi construída usando o método *neighbourjoining* baseado na sequência do rDNA 16S. Os números nas ramificações indicam a porcentagem dos valores de *bootstrap*(1000 réplicas). Entre parênteses, os números de acesso no *GenBank* (SAKAMOTO & BENNO, 2006).

A composição da microbiota intestinal é alterada ao longo da vida do hospedeiro. O início da exposição dos seres humanos ao mundo microbiano começadurante a gestação. Cordão umbilical, fluido amniótico, mecônio, placenta e membrana fetal promovem o contato com espécies que colonizam o intestino e

a região urogenital da mãe, como espécies de *Enterococcus* e *Lactobacillus* (THUM *et al.*, 2012). Ao nascer, o indivíduo entra em contato com bactérias diferentes, que variam de acordo com o tipo de parto (cesariana ou natural), tipo de alimento recebido (leite materno ou fórmula) e grau de exposição ao ambiente

5 (SCHOLTENSE *et al.*, 2012).

O intestino é colonizado, inicialmente, por bactérias anaeróbias facultativas e o consumo gradual do oxigênio por estas bactérias favorece a alteração da composição da microbiota, possibilitando a instalação de microrganismos anaeróbios obrigatórios, como *Parabacteroides* (PENDERS *et al.*, 2006;

10 WEXLER, 2007).

A microbiota intestinal adulta alberga uma microbiota extremamente rica e diversificada. Estima-se que a microbiota possa representar mais de 100 trilhões de células, 10 vezes mais que as células eucarióticas do próprio hospedeiro (LEY *et al.*, 2006; TURNBAUGH *et al.*, 2007).

Essa população microbiana é encontrada nos intestinos delgado e grosso, sendo o último o mais densamente colonizado. A concentração de bactérias no intestino delgado proximal é extremamente baixa, cerca de 10^4 UFC/g de conteúdo fecal, sendo observadas, especialmente, bactérias anaeróbias facultativas, como *Lactobacillus*. Já no íleo distal, a concentração bacteriana é bem maior (10^8 UFC/g

15 de conteúdo fecal) e a microbiota torna-se bastante diversificada, incluindo coliformes e várias espécies de bactérias anaeróbias obrigatórias, como *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Clostridium*. O baixo potencial de oxirredução no íleo explica a presença da microbiota anaeróbia na região

20 (BARBOSA *et al.*, 2010).

O cólon é o sítio mais densamente colonizado, albergando, principalmente, microrganismos anaeróbios obrigatórios (KULAGINA *et al.*, 2012). Entre as bactérias predominantes, duas populações podem ser distinguidas com relação à densidade populacional, a microbiota dominante (10^9 - 10^{11} UFC/g de fezes), composta exclusivamente por anaeróbios obrigatórios (*Parabacteroides*,

25 *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*),

30 e a microbiota subdominante (10^7 - 10^8 UFC/g de fezes), que inclui,

predominantemente, anaeróbios facultativos e microaerófilos, como *Escherichia coli*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* (COSTELLO *et al.*, 2009).

Embora se acredite que o sítio seja colonizado por mais de 1000 espécies distintas de bactérias, a grande maioria pertence aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, no qual *Parabacteroides* se inclui (MARCHESI, 2010). Estes dois
5 filos abrangem mais de 98% das sequências de 16S rDNA detectadas na microbiota intestinal de mamíferos (LEY *et al.*, 2006).

A interação entre estes dois filos é essencial para o hospedeiro e está relacionada com diversos fatores, como, por exemplo, obesidade (MAHOWALD *et al.*, 2009). A proporção relativa dos dois filos interfere na homeostase energética
10 do organismo, sendo a proporção de Bacteroidetes menor nos obesos que em pessoas magras (BAJZER & SEELEY, 2006; TURNBAUGH *et al.*, 2006; CANI & DELZENNE, 2007; DUNCAN *et al.*, 2008; TURNBAUGH *et al.*, 2009).

Os gêneros *Parabacteroides* e *Bacteroides* destacam-se entre as bactérias
15 incluídas nos filos dominantes, pois são predominantes no cólon e representam, aproximadamente, 25% das bactérias cultiváveis isoladas das fezes. No gênero *Parabacteroides*, destaca-se a espécie *P. distasonis*, observada em concentração elevada (10^{10} UFC/g de fezes). Outras espécies, como *P. goldsteinii* e *P. merdae* são encontradas em densidades bem inferiores (WEXLER, 2007).

Avanços na área da Genética Molecular possibilitaram o desenvolvimento
20 de estudos mais refinados para elucidação da composição qualitativa e quantitativa da microbiota intestinal. Estes estudos revelaram que, aproximadamente, entre 60 e 80% das espécies de bactérias intestinais humanas não foram, ainda, cultivadas (LI *et al.*, 2009). No que se refere a *Parabacteroides*,
25 concentrações elevadas também foram detectadas no cólon empregando esta metodologia (DORE *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2003; RIGOTTIER-GOIS *et al.*, 2003; FOGARTY & VOYTEK, 2005; PANG *et al.*, 2005; KULAGINA *et al.*, 2012).

Espécies de *Parabacteroides* são observadas em recém-nascidos por volta
de 10 dias após o nascimento (WEXLER, 2007). Como membros da microbiota
30 indígena, realizam a digestão de polissacarídeos da dieta (HOOPER *et al.*, 2002); exercem efeito antagonista, prevenindo a colonização por patógenos (HOPKINS & MACFARLANE, 2003); modulam a produção de toxina bacteriana por

patógenos, como *Clostridium difficile*(COUTHIER *et al.*, 1985); e estimulam a resposta imune local, ativando células de defesa (MAZMANIAN *et al.*, 2005).

No que se refere a metabolismo, estudos empregando métodos de Genética Molecular detectaram genes relacionados à degradação de polissacarídeos em *P. distasonis*(KUWAHARA *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2007). Além disto, ensaios com animais demonstraram sua capacidade marcante de fermentação (MARTINEZ *et al.*, 2010). Este processo resulta na produção de carboidratos simples e de uma gama de ácidos graxos de cadeia curta voláteis, principalmente succinato e acetato, que são absorvidos e utilizados pelo hospedeiro como energia. Esta capacidade se deve à síntese de várias enzimas, como neuraminidase (ou sialidase) e glicosidases (HOOPER *et al.*, 2002).

P. distasonis também desempenha papel fundamental na modulação do sistema imune de mucosa do hospedeiro, devido, principalmente, a um componente de membrana (mPd), que apresenta atividade anti-inflamatória, prevenindo doenças inflamatórias intestinais. Esta habilidade tem sido estudada como estratégia terapêutica para prevenção de doenças inflamatórias crônicas, como colite ulcerativa e doença de Crohn (KVERKA *et al.*, 2010).

Estudos recentes evidenciaram que os benefícios da presença de *Parabacteroides* vão além das funções mais conhecidas. Como exemplo, pode ser citada a produção de butirato, decorrente de fermentação, que pode apresentar propriedades antineoplásicas (KIM & MILNER, 2007; VIPPERLA & O'KEEFE, 2012). Ainda, algumas espécies apresentam a habilidade de transformar componentes tóxicos em atóxicos no intestino (SMITH *et al.*, 2006).

1.1.4 PRESENÇA NA MICROBIOTA INTESTINAL DE AVES

O intestino das aves é colonizado por inúmeras espécies de bactérias, fungos e protozoários, que formam um sistema complexo e dinâmico, no qual as bactérias destacam-se como microrganismos predominantes (GABRIEL *et al.*, 2006). Esta comunidade microbiana é influenciada por vários fatores, como raça,

localização geográfica, e, principalmente, por ingredientes da dieta do animal, níveis nutricionais e características físicas dos alimentos (HUET *et al.*, 2007).

O trato intestinal de aves recém-nascidas contém concentrações elevadas de *Streptococcus*, enterobactérias e *Clostridium*. Contudo, esta não é uma
5 população estável e, à medida que os animais crescem, a microbiota sofre alterações e torna-se mais complexa, constituída, predominantemente, por bactérias anaeróbias obrigatórias (APAJALAHTI *et al.*, 2004).

Um ponto crucial na aquisição da microbiota é a proteção das aves recém-nascidas contra patógenos, com destaque *Campylobacter* e *Salmonella*, agentes
10 de infecções intestinais em seres humanos. Estes microrganismos colonizam o trato intestinal das aves sem efeitos prejudiciais para as mesmas, tornando-as, geralmente, portadoras assintomáticas. Com isso, a ave é frequentemente relacionada como o principal reservatório das bactérias, sendo considerada importante veículo de transmissão para seres humanos (HAVELAAR *et al.*, 2012).

15 A microbiota varia qualitativa e quantitativamente ao longo do trato intestinal das aves, sendo que a densidade populacional tende a aumentar da porção proximal para a distal (RICHARDS *et al.*, 2005). Do ponto de vista microbiológico, o intestino pode ser dividido em duodeno e intestino delgado, onde o número de bactérias é relativamente baixo, geralmente inferior a
20 10^8 UFC/g de conteúdo fecal; ceco, região de maior densidade populacional, aproximadamente 10^{11} UFC/g de conteúdo fecal; e intestino grosso, o qual é relativamente curto e apresenta bactérias características do intestino delgado e do ceco (YEGANI & KORVER, 2008).

Como mencionado, o ceco das aves é densamente colonizado por
25 microrganismos, especialmente bactérias anaeróbias obrigatórias. Entre eles, são observados *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Clostridium* (GABRIEL *et al.*, 2006). Segundo Apajalahti *et al.* (2001), o gênero *Ruminococcus* abrange, aproximadamente, 20% da comunidade bacteriana deste sítio, seguindo-se *Streptococcus* (13%) e *Bacteroides* e *Parabacteroides* (9%).
30 Segundo Apajalahti *et al.* (2004), dados originados de estudo que empregou técnicas de Genética Molecular indicam que 90% das espécies bacterianas presentes no intestino das aves ainda são desconhecidas. Assim, ainda há muito

a se estudar sobre composição e diversidade de bactérias no ceco intestinal de aves.

Vários estudos descrevem níveis diferentes de *Parabacteroides*, no ceco, variando entre 10^7 e 10^{10} UFC/g de conteúdo fecal (LIU *et al.*, 2003; ZHU & JOERGER, 2003; BJERRUM *et al.*, 2006; WISE & SIRAGUSA, 2007; OLSEN *et al.*, 2008). A maioria destes estudos demonstra que a bactéria, que se estabelece a partir do sétimo dia de vida, é um membro subdominante da microbiota intestinal de aves, diferentemente do padrão da microbiota humana, na qual faz parte da microbiota dominante (ZHU & JOERGER, 2003; OLSEN *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2012).

1.1.5 PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA

O potencial patogênico é determinado pelas habilidades das quais o microrganismo dispõe para o estabelecimento da infecção, como a capacidade de adesão às células do hospedeiro, de invasão tecidual, de resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro, de produção de metabólitos e de indução de danos teciduais (LEE, 2009).

Muitas bactérias anaeróbias obrigatórias exibem estas características e são, de fato, frequentemente isoladas de uma variedade de espécimes clínicos. Entre elas, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* e *Clostridium* são, geralmente, consideradas como os patógenos mais importantes (KASPER & COHEN-PORADOSU, 2008).

Bacteroides e *Parabacteroides* merecem menção devido à participação em uma variedade de infecções oportunistas de origem endógena, tanto intestinais como extraintestinais. Nestas infecções, geralmente de natureza polimicrobiana, *B. fragilis* é, muitas vezes, a espécie predominante (BROOK, 2010). No gênero *Parabacteroides*, *P. distasonis* destaca-se por sua participação em infecções intra-abdominais, como abscessos abdominais, apendicites, peritonites e bacteremias (AL-TAWFIQ, 2007; AWADEL-KARIEM *et al.*, 2010).

P. distasonis liga-se às células epiteliais por meio de adesinas (NAKANO *et al.*, 2008). Após a aderência bacteriana às células do hospedeiro, ocorre invasão tecidual, facilitada por traumas, hipóxia e presença de ferida cirúrgica, dentre outras alterações (LEE, 2009). A bactéria pode, ainda, produzir enzimas extracelulares, como hialuronidasas, heparinases, proteases, DNases, 5 colagenases, neuraminidasas e fosfolipases, capazes de promover hidrólise nos tecidos, iniciando a infecção e auxiliando na manutenção das bactérias no organismo hospedeiro (XU *et al.*, 2007).

Dentre os vários fatores de virulência, a cápsula polissacarídica é de 10 extrema importância no processo de infecção por estas bactérias, pois, além de atuar protegendo-as contra a fagocitose e a atividade do soro, é responsável pela formação de abscesso, contribuindo, de forma definitiva, para a virulência (TZIANABOS *et al.*, 1993).

As amostras de *Parabacteroides* são potencialmente resistentes a uma 15 ampla variedade de antimicrobianos β -lactâmicos e aminoglicosídeos e, recentemente, muitas espécies têm demonstrado resistência a clindamicina, metronidazol, carbapenêmicos e fluoroquinolonas (WEXLER, 2007). O nível elevado de resistência a uma variedade de drogas antimicrobianas já foi reportado em vários países, inclusive no Brasil (SNYDMAN *et al.*, 2007; WYBO *et al.*, 2007; BOENTE *et al.*, 2010; NAKANO *et al.*, 2011), e tem gerado preocupação 20 pelo fato de que espécies de *Parabacteroides* podem se tornar reservatórios de genes de resistência em seres humanos e outros animais, como reportado em aves (GARCIA *et al.*, 2012), os quais podem ser transferidos para outras amostras bacterianas, incluindo organismos classicamente patogênicos. Esta 25 plasticidade genética tem contribuído para a disseminação do fenômeno de resistência múltipla a drogas, observado em várias bactérias (NAKANO *et al.*, 2004; BETRIU *et al.*, 2005; FILLE *et al.*, 2006).

1.2 BACTERIOCINAS

1.2.1 ASPECTOS CONCEITUAIS

5

Os microrganismos expressam uma variedade de sistemas de defesa, entre eles a capacidade de produzir substâncias como antibióticos, ácido láctico, peróxido de hidrogênio, agentes líticos, como lisozimas, e numerosos peptídeos biologicamente ativos (GALVEZ *et al.*, 2007).

10 Peptídeos antimicrobianos são biomoléculas sintetizadas tanto por organismos eucariotos como procaríotos, que estão envolvidos em múltiplas funções, tais como proteção contra outros microrganismos, neutralização de endotoxina, atividades imunomodulatórias, indução da angiogênese e cicatrização de feridas. Peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias são denominados
15 bacteriocinas (MENDOZA *et al.*, 2010).

As bacteriocinas constituem um grande grupo heterogêneo de peptídeos antimicrobianos que variam quanto a características bioquímicas, mecanismo de ação, massa molecular e codificação genética (COTTER *et al.*, 2005; DRIDER *et al.*, 2006, COTTER *et al.*, 2012). Podem ser distinguidas dos antibióticos pelo
20 mecanismo de ação, por serem digeridas por enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano, pela fase de produção e, principalmente, por serem sintetizadas no nível de ribossomos, não fazendo parte do metabolismo secundário (CLEVELAND, 2001).

As bacteriocinas são elaboradas por vários grupos de bactérias, tanto
25 Gram positivas como Gram negativas, e por algumas linhagens do domínio Archaea, podendo conferir vantagens ecológicas, especialmente em comunidades bacterianas complexas, como o trato intestinal de animais e solo, dentre outras (DOBSON *et al.*, 2012). Estas substâncias influenciam a dinâmica de populações bacterianas, conferindo vantagem competitiva à linhagem produtora (MAJEED *et al.*, 2011).
30

A atividade de bacteriocinas pode restringir-se a um grupo específico de microrganismos taxonomicamente relacionados ou o espectro de ação das

substâncias pode ser mais amplo (BOWDISH *et al.*, 2005). Pode ser observado efeito bactericida ou bacteriostático. As bacteriocinas podem formar poros na membrana citoplasmática das células alvo, inibir a síntese da parede celular ou apresentar atividade enzimática (RNase ou DNase) (COTTER *et al.*, 2012).

5 O estudo das bacteriocinas começou com a observação de Pasteur, em 1877, de colônias que produziam substâncias antagonistas que inibiam outros microrganismos. Contudo, foi o trabalho de Gratia (1925) que descreveu estas substâncias produzidas por *Escherichia coli*, denominadas colicinas (GRATIA & FREDERICQ, 1946). O termo bacteriocina foi posteriormente introduzido por
10 Jacob (1953).

Os estudos referentes a colicinas contribuíram para o desenvolvimento de métodos de detecção e isolamento de outras classes de bacteriocinas, inclusive daquelas produzidas por bactérias Gram positivas, destacando-se as bactérias do ácido láctico, especialmente em decorrência de suas aplicações na área de
15 alimentos (SETTANNI & CORSETTI, 2008).

1.2.2 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR ARCHAEA

20 Os organismos incluídos no domínio Archaea produzem sua própria família de compostos antimicrobianos, conhecidos como arqueocinas. As halocinas, produzidas por halobactérias, são, até o momento, as únicas bacteriocinas produzidas por estes organismos caracterizadas, e poucas halocinas já foram descritas com detalhes. A primeira halocina descoberta, S8, é um
25 peptídeo hidrofóbico curto de 36 aminoácidos, processado a partir de uma pró-proteína de 34kDa, codificada por um megaplasmídeo. Essa halocina é muito resistente e estável, podendo ser dessalinizada, fervida, submetida a tratamento com solventes orgânicos e estocada a 4°C por períodos longos sem perder sua atividade (RILEY & WERTZ, 2002).

30 A expressão desta proteína é dependente da fase de crescimento do microrganismo. Observam-se concentrações baixas de S8 durante a fase exponencial e um aumento da síntese da bacteriocina durante a transição para a

fase estacionária (SHAND *et al.*, 1998). Sua produção está ligada a limitação das fontes de nutrientes. Assim, quando os recursos do ambiente são escassos, as células produtoras lisam células suscetíveis, enriquecendo o conteúdo nutricional do ambiente local. Como proteínas estáveis, as halocinas podem permanecer no ambiente por tempo suficiente para reduzir a competição durante as fases subsequentes de fluxo de nutrientes. A estabilidade destas bacteriocinas pode ajudar a explicar porque há tão pouca diversidade em ambientes hipersalinos habitados por halobactérias. (RILEY & WERTZ, 2002).

Apenas o mecanismo de ação da halocina H6, inibição de antiporte de Na^+/H^+ , já foi esclarecido. Por outro lado, o mecanismo de imunidade ainda é desconhecido (RILEY & WERTZ, 2002).

1.2.3 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS

Bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram positivas compreendem um amplo e diverso grupo de peptídeos, que variam em termos de tamanho, alvo microbiano, modo de ação e mecanismo de imunidade (COTTER *et al.*, 2012). Entretanto, apresentam características típicas; geralmente, são catiônicas, anfifílicas e permeabilizantes de membrana (HENG *et al.*, 2007).

Existem vários sistemas de classificação para as bacteriocinas de bactérias Gram positivas. Um destes sistemas é a classificação proposta por Cotter e colaboradores (2005), que divide as bacteriocinas em três grupos: classe I, que abriga peptídeos que sofrem modificação pós-traducional e contêm anéis de lantionina em sua estrutura (lantibióticos); classe II, que inclui bacteriocinas que não passam por modificação pós-traducional; e classe III, na qual estão agrupadas as bacteriolisinas, as quais apresentam mecanismo de ação distinto das demais classes, promovendo hidrólise da parede celular bacteriana.

As bacteriocinas da classe I, também denominadas lantibióticos, grupo do qual a nisina, bacteriocina amplamente utilizada e estudada, pertence, são peptídeos com massa molecular inferior a 5 kDa, termoestáveis e submetidos a extensas modificações pós-traducionais, resultando na formação de aminoácidos

incomuns, como lantionina, metil lantionina, ácido aminobutírico, deidrobutirina e deidroalanina, os quais formam pontes covalentes, resultando em anéis internos e conferindo características estruturais específicas. Além disso, as substituições pós-traducionais de D-alaninas por L-serinas também podem ocorrer (COTTER *et al.*, 2005; DEEGAN *et al.*, 2006). Os estudos sobre o mecanismo de ação dos lantibióticos revelam que estas bacteriocinas podem atuar sobre a membrana citoplasmática, através de ligação específica ou não específica; inibir a síntese da parede celular e a atividade de enzimas com RNases ou DNases (COTTER *et al.*, 2012).

Bacteriocinas da classe II são peptídeos com massa molecular inferior a 10 kDa, termoestáveis e hidrofóbicos. Ao contrário dos lantibióticos, não sofrem modificações pós-traducionais. Geralmente, apresentam estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e a morte celular (OPPEGARD *et al.*, 2007).

As bacteriocinas de classe III, também denominadas bacteriolisinas, são peptídeos termolábeis, com massa molecular superior a 30 kDa, que apresentam maior complexidade tanto na estrutura como no modo de ação. Seu mecanismo de ação é distinto das demais bacteriocinas, pois promovem a lise da célula suscetível catalisando a hidrólise do peptideoglicano (COTTER *et al.*, 2005).

A síntese de bacteriocinas envolve diferentes genes, que estão, geralmente, organizados em óperons, e podem estar localizados no cromossomo bacteriano, em plasmídeos ou em transpósons (CHEIGH & PYUN, 2005).

Geralmente, o óperon contém os genes responsáveis pela produção do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina, pela produção das proteínas do transportador ABC que externalizam a bacteriocina e que codificam uma proteína acessória, não pertencente ao transportador ABC, mas, necessária para a secreção da bacteriocina (NES *et al.*, 1996). Normalmente, as células produtoras de bacteriocinas são imunes aos seus peptídeos. Esta característica é mediada por genes que codificam as proteínas de imunidade, que são expressos juntamente com o gene estrutural da bacteriocina e protegem a célula produtora da ação

antimicrobiana do seu próprio peptídeo (HÉCHARD & SAHL, 2002). A regulação da expressão da bacteriocina é dependente da densidade celular e, geralmente, é controlada por componentes típicos de sistema *quorum-sensing* (DOBSON *et al.*, 2012).

Classicamente o espectro de ação dessas bacteriocinas está restrito a bactérias Gram positivas filogeneticamente relacionadas, mas, sabe-se que o espectro de inibição de algumas bacteriocinas é muito maior. Como exemplo, a nisina A, produzida por *Lactococcus lactis*, é capaz de inibir uma gama de bactérias, incluindo *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (MOTA-MEIRA *et al.*, 2005). Além disto, já foi descrita a inibição de bactérias Gram negativas, como *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* e *Neisseria* (MORENCY *et al.*, 2001).

1.2.4 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS

As bactérias Gram negativas produzem uma variedade de bacteriocinas, que são nomeadas tanto pelo gênero (por exemplo, klebicinas de *Klebsiella pneumoniae*), como pela espécie (colicinas de *E. coli*, marcescinas de *Serratia marcescens* e cloacinas de *Enterobacter cloacae*). As bacteriocinas produzidas por *Pseudomonas* são, geralmente, denominadas piocinas (CHAVAN & RILEY, 2007). As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas são representadas, principalmente, por aquelas sintetizadas por membros da família Enterobacteriaceae, especialmente *E. coli* (CASCALES *et al.*, 2007).

Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas diferem daquelas sintetizadas por amostras Gram positivas em vários aspectos ecológicos e evolutivos. Em geral, em bactérias Gram negativas, a biossíntese das bacteriocinas não é auto-regulada e a produção é um fenômeno letal para célula produtora. Além disto, o espectro de ação é menos amplo e a liberação da bacteriocina não é controlada por mecanismos específicos de regulação e sim por mecanismos regulatórios comuns, como o sistema SOS (RILEY & WERTZ, 2002).

Três grupos principais de bacteriocinas de bactérias Gram negativas podem ser diferenciados, com base, principalmente, no tamanho: classe I, que inclui peptídeos maiores, com massa molecular entre 25 e 80 kDa, denominados colicinas ou “colicin-like”, produzidos, principalmente, por enterobactérias, em particular, *E. coli*; classe II, representada pelas microcinas, cuja massa molecular é inferior a 10 kDa; e as bacteriocinas semelhantes a cauda de fagos, “phage tail-like bacteriocins”, que são estruturas complexas, compostas de um conjunto de peptídeos multiméricos (CHAVAN & RILEY, 2007).

Bacteriocinas semelhantes a cauda de fagos são partículas resistentes a nucleases e proteases, que matam as células suscetíveis por despolarização da membrana celular (STACHURA *et al.*, 1969;. KURODA & KAGIYAMA, 1983; NAKAYAMA *et al.*, 2000; STRAUCH *et al.*, 2003). Estas moléculas podem ter sido originadas de fagos que evoluíram e se tornaram funcionalmente semelhantes a bacteriocinas. A piocina R2, produzida por *Pseudomonas*, parece ser um remanescente de fago P2, enquanto que a piocina F2 é semelhante ao fago lambda (NAKAYAMA *et al.*, 2000).

As colicinas têm sido extensivamente estudadas e representam um modelo para a pesquisa de outras bacteriocinas de bactérias Gram negativas. Mais de 30 colicinas já foram descritas, sendo que 21 já estão bem caracterizadas (CASCALES *et al.*, 2007).

A maioria das colicinas é codificada por genes plasmidiais, organizados em óperons, que incluem um gene que confere imunidade para a célula produtora; um gene que codifica a estrutura da proteína e um gene envolvido na liberação da mesma (CURSINO *et al.*, 2002). A produção de colicinas envolve um número menor de genes que bacteriocinas de bactérias Gram positivas (NAGAO *et al.*, 2006).

A produção de colicinas é regulada pelo sistema SOS, sendo, portanto, produzida em condições de estresse, como depleção de nutrientes e alta densidade populacional. Além disto, a produção de colicina é letal para a bactéria produtora, pois a liberação da molécula para o ambiente envolve a lise da célula, pela co-expressão da proteína de lise (RILEY & WERTZ, 2002).

As colicinas apresentam, pelo menos, três domínios, com funções distintas. O domínio N-terminal é responsável pela translocação através da célula até seu alvo, o domínio central representa a maior parte da estrutura e é responsável pelo reconhecimento de receptores específicos na célula alvo e o domínio C-terminal é responsável pela ação na célula-alvo (CRAMER *et al.*, 2004) e está envolvido na ligação da proteína de imunidade (CASCALES *et al.*, 2007).

A interação entre colicina e célula alvo inicia-se pela ligação da colicina a receptores presentes na membrana da célula, geralmente, proteínas que permitem a entrada de nutrientes específicos, como nucleosídeos e vitaminas (CASCALES *et al.*, 2007). A bacteriocina é, posteriormente, importada para dentro da célula, através do domínio de translocação, que pode ser TolA ou TonB, e move-se através da membrana exterior até atingir a membrana interior, no caso de colicinas formadoras de poros, resultando na despolarização da membrana, ou move-se para o citoplasma, no caso de endonucleases de DNA e RNA. Adicionalmente, existem as colicinas capazes de hidrólise ou inibir a ligação β -1,4 entre N-acetil glucosamina e ácido N-acetilmurâmico da parede celular bacteriana, induzindo a formação de esferoplastos e, conseqüentemente, a lise celular (RILEY, 2011).

As microcinas são bacteriocinas menores que as colicinas, são produzidas por enterobactérias e compartilham mais propriedades com bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas do que Gram negativas, especificamente, com as bacteriocinas da classe II. Assim, apresentam termoestabilidade, resistência a proteases, hidrofobicidade relativa, resistência a valores extremos de pH e produção não regulada pelo sistema SOS. Até o momento, 14 microcinas foram descritas, das quais somente sete foram isoladas e totalmente caracterizadas (PONS *et al.*, 2002; GILLOR *et al.*, 2004).

As microcinas são codificadas por genes que podem estar localizados tanto em plasmídeos como no cromossomo. Elas exibem diversidade no modo de ação (DUQUESNE *et al.*, 2007); algumas são ativas como peptídeos não modificados, enquanto outras são amplamente modificadas por maturação enzimática (DUQUESNE *et al.*, 2007; SEVERINOV *et al.*, 2007).

Duas classes de microcinas podem ser discriminadas. A classe I, que inclui substâncias com tamanho inferior a 5 kDa, submetidas a modificações pós-traducionais, e a classe II, com tamanho entre 7 e 10 kDa, que é subdividida em duas classes, classe IIa, que contém ligações dissulfeto, mas nenhuma outra modificação pós-traducional, e classe IIb, que são peptídeos lineares que podem apresentar uma modificação pós-traducional na região C-terminal e são denominadas microcinas sideróforas (DUQUESNE *et al.*, 2007).

Bacteriocinas produzidas por *Pseudomonas* também são extensivamente estudadas. Os genes são cromossômicos e há três tipos de piocinas descritos: F, R e S. Os tipos R e F (“phage tail-like bacteriocins”) são produzidos por mais de 90% das bactérias e o tipo S (“colicin-like”), por cerca de 70%. Observa-se alta frequência de ocorrência de genes associados à síntese de piocinas; as amostras de *Pseudomonas* produzem, frequentemente, mais de um tipo de bacteriocina (MICHEL-BRIAND & BAYSSE, 2002).

A maioria das bacteriocinas sintetizadas por amostras Gram negativas apresenta espectro limitado de ação (TAGG *et al.*, 1976; JACK *et al.*, 1995). Porém, algumas bactérias, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, espécies orais de *Bacteroides* e *Pseudomonas* produzem bacteriocinas ativas contra uma ampla gama de grupos bacterianos (NAKAMURA *et al.*, 1981; HAMMOND *et al.*, 1987; MIRANDA *et al.*, 1993).

1.2.5 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *Parabacteroides* e *Bacteroides*

Além da família Enterobacteriaceae, outros constituintes da microbiota intestinal também exibem frequência elevada de produção de bacteriocinas, como membros dos gêneros *Parabacteroides* e *Bacteroides*.

Em relação ao gênero *Parabacteroides*, há apenas estudos sobre a expressão de antagonismo por *P. distasonis* (BOOTH *et al.*, 1977; FARIAS *et al.*, 1992). Existem mais relatos referentes à produção de substâncias antagonistas por *Bacteroides*, principalmente *B. fragilis*, bem como investigações mais aprofundadas incluindo purificação e caracterização dessas

substâncias(BOOTH *et al.*,1977; MOSSIE *et al.*, 1979; RILEY & MEE, 1982; HAYES *et al.*, 1983; SOUTHERN *et al.*,1984; FARIAS *et al.*, 1992; MIRANDA *et al.*,1993; FARIAS *et al.*, 1994; PAPASTATHOPOULOU *et al.*, 1997; AVELAR *et al.*, 1999).

5 A primeira descrição da produção de bacteriocinas por espécies de *Bacteroides* foi realizada por Beerens& Baron (1965). Cerca de 10 anos depois, foi publicado o primeiro estudo referente a purificação e caracterização parcial de uma bacteriocina sintetizada por *Bacteroides* (BOOTH *et al.*, 1977). Os autores descreveram uma substância produzida por uma amostra fecal de *B. fragilis* e,
10 atualmente, bacteriocinas com características diferentes desta, no que se refere a massa molecular e estabilidade frente a diferentes valores de pH e temperatura já foram purificadas (MOSSIE *et al.*, 1979; HAYES *et al.*, 1983; SOUTHERN *et al.*,1984; MIRANDA *et al.*,1993;FARIAS *et al.*, 1994; AVELAR *et al.*, 1999). Em relação ao modo de ação, MOSSIE *et al.* (1979) descreveram bacteriocina
15 produzida por *Bacteroides* que atua inibindo a síntese de RNA de amostras taxonomicamente relacionadas.

 Pouco se sabe sobre o possível papel das bacteriocinas na ecologia bacteriana do cólon humano. Um estudo revelou que amostras intestinais de *B. fragilis* são mais frequentemente produtoras de bacteriocinas, bem como
20 resistentes a estas substâncias, do que amostras não intestinais (AVELAR *et al.*, 1999), indicando a importância ecológica da substância em um ambiente microbiano complexo como o intestino grosso.

 A produção de e a suscetibilidade a bacteriocinas já foi sugerida como um possível sistema de tipagem de amostras clínicas de *Bacteroides*, com aplicações
25 epidemiológicas (MERCER *et al.*, 1984).

1.2.6 PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS

30 A detecção de bacteriocinas em laboratório nem sempre é um processo simples, pois depende da simulação de condições ambientais adequadas para sua síntese, como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes (RILEY &

WERTZ, 2002). Mesmo assim, muitas bacteriocinas produzidas por diferentes bactérias já foram descritas. Entretanto, apenas algumas foram completamente purificadas e caracterizadas, devido à complexidade do procedimento, além da natureza extremamente heterogênea das bacteriocinas (TIWARI & SRIVASTAVA, 2008), não sendo possível a proposição de um método de purificação aplicável a todos os organismos (LOPEZ *et al.*, 2007).

Como a maior parte das bacteriocinas é secretada no meio de cultura, a maioria das estratégias inicia-se com uma etapa de concentração destes peptídeos a partir dos sobrenadantes das culturas. Muitas bacteriocinas não são produzidas em grandes quantidades pela amostra produtora, o que torna muito importante concentrar o sobrenadante que contém a substância antimicrobiana nas etapas iniciais do processo (PINGITORE *et al.*, 2007). Para isto, várias abordagens são utilizadas, incluindo filtração por diálise ou ultrafiltração (MURIANA & KLAENHAMMER, 1991; TEN BRINK *et al.*, 1994); precipitação de proteínas pelo uso de sais, principalmente, sulfato de amônio (concentração variável de 0-80%) (FARIAS *et al.*, 1994; FOLLI *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2003), ou ácidos (HASTINGS *et al.*, 1991); e extração das bacteriocinas utilizando solventes orgânicos, como clorofórmio (BURIANEK & YOUSEF, 2000; PARK *et al.*, 2003). O sobrenadante também pode ser concentrado por secagem a vácuo ou liofilização (PIVA & HEADON, 1994).

Embora as etapas descritas sejam utilizadas para a extração de diferentes peptídeos antimicrobianos, o grau de pureza da preparação irá variar dependendo da composição do meio de cultura e das condições de extração. Por isto, passos subsequentes, como separação por cromatografia de troca catiônica (OHMOMO *et al.*, 2000) e aniônica (LEE *et al.*, 2007), interação hidrofóbica (MARTINEZ *et al.*, 1998), gel filtração (FLEURY *et al.*, 1996) e cromatografia líquida de fase reversa (UTENG *et al.*, 2002), são frequentemente utilizados com a finalidade de eliminar os agentes contaminantes e permitir a obtenção da bacteriocina com alto grau de pureza.

1.2.7 APLICAÇÃO DE BACTERIOCINAS

A maior parte das pesquisas que envolvem bacteriocinas é focada, principalmente, na sua aplicação na conservação de alimentos. Nos últimos 20 anos, mais de 700 patentes relativas a bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico foram registradas, das quais cerca de 400 são ligadas à preservação de alimentos. As bactérias do ácido láctico são produtoras de bacteriocinas atraentes pela não toxicidade, alta estabilidade ao calor e atividade de enzimas proteolíticas do trato digestivo e atividade contra bactérias patogênicas, incluindo amostras que esporulam (COTTER *et al.*, 2005). Essas características conferem potencial para preservação de alimentos, possibilitando o aumento da vida de prateleira dos produtos e podendo substituir ou atuar em combinação com métodos tradicionais de conservação de alimentos (SHILLINGER *et al.*, 1996; ONDA *et al.*, 2003).

A nisina, produzida por linhagens de *Lactococcus lactis*, é uma bacteriocina extensamente utilizada na indústria de alimentos. Ela apresenta *status* GRAS, conferido pela *Food and Drug Administration* (FDA, 1988) e é aprovada pela Organização Mundial da Saúde como conservante de alimentos em mais de 50 países. Atualmente, além da nisina, a pediocina PA-1 também é utilizada, e elas são comercializadas para uso como aditivos em alimentos como “Nisaplin” e “ALTA 2341”, respectivamente (COTTER *et al.*, 2005).

Deve-se destacar que, nos últimos anos, ocorreu uma mudança no estudo da aplicação de bacteriocinas e elas passaram a ser consideradas um atrativo na indústria farmacêutica, por serem promissores antimicrobianos alternativos. Este interesse aumentou, principalmente, devido a preocupação crescente com a disseminação da resistência bacteriana a quimioterápicos (NISHIE *et al.*, 2012). Algumas bacteriocinas apresentam propriedades desejáveis para aplicação *in vivo*, tais como a estabilidade a baixo pH e calor, a simplicidade de produção e extração, a alta atividade e a ausência de citotoxicidade (SAHL & BIERBAUM, 2008).

No campo da Medicina Veterinária, há vários estudos utilizando bacteriocinas e bactérias produtoras de bacteriocina em ensaios animais, na melhoria da nutrição e saúde animal, através da manipulação da fermentação no

rúmen de bovinos (SAR *et al.*, 2005; KISIDAYOVA *et al.*, 2009); no controle de infecções em animais, como mastite bovina (RYAN *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2007); e na inibição de agentes patogênicos entéricos em aves e outros animais, como *Campylobacter* (SVETECH *et al.*, 2005) e *Salmonella* (LAUKOVA *et al.*, 2004).

5 Na Medicina Humana, existem inúmeras pesquisas que apontam a utilização de amostras produtoras de bacteriocinas e debacteriocinas na profilaxia e tratamento de úlcera gástrica associada a *Helicobacter pylori* (KIM *et al.*, 2003); no controle de infecções, pela atividade antimicrobiana sobre diversas bactérias patogênicas, tais como *Salmonella* (LOPEZ *et al.*, 2007), *Streptococcus*
10 *pneumoniae* (SVETECH *et al.*, 2011), *Clostridium difficile* (REA *et al.*, 2011) e *Staphylococcus aureus* multirresistentes (KRUSZEWSKA *et al.*, 2004; MOTA-MEIRA *et al.*, 2005), dentre outras; em produtos odontológicos, inibindo a colonização por *Streptococcus mutans* (LESTER & SIMMONDS, 2012); e em produtos dermatológicos, para controle de infecção por *Propionibacterium acnes*
15 (KANG *et al.*, 2009).

Diferentes aplicações têm sido sugeridas para bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas. Colicinas e microcinas produzidas por *E. coli* são capazes de inibir uma variedade de bactérias patogênicas Gram negativas contra as quais as bacteriocinas de bactérias do ácido láctico não apresentam atividade.
20 As bactérias produtoras de bacteriocinas apresentam grande potencial probiótico, associado a seu emprego para a prevenção de infecção por bactérias patogênicas, como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteuse* *Yersinia*, em seres humanos e outros animais (DUQUESNE *et al.*, 2007).

25

2 JUSTIFICATIVA

O gênero *Parabacteroides* inclui bastonetes Gram negativos anaeróbios obrigatórios, reconhecidos como membros da microbiota indígena da cavidade oral e dos tratos respiratório, intestinal e urogenital de seres humanos e de outros animais, inclusive aves. Espécies do gênero desempenham papel relevante para o hospedeiro e podem agir como patógenos oportunistas, agentes de infecções associadas a taxas elevadas de morbidade e mortalidade. Entre os representantes do recém-criado gênero *Parabacteroides*, merece menção a espécie *P. distasonis*, anteriormente denominada *Bacteroides distasonis*. O microrganismo está associado à etiopatogenia de diversas doenças que acometem os seres humanos, entre elas, infecções intra-abdominais.

Os microrganismos expressam uma ampla gama de habilidades que podem representar vantagem seletiva, especialmente em ambientes densamente colonizados. Bacteriocinas são substâncias antagonistas de natureza proteica que exercem papel relevante nas relações ecológicas bacterianas, podendo favorecer as amostras produtoras, auxiliando na competição contra outras bactérias. Embora a síntese de bacteriocinas já tenha sido relatada para uma enorme variedade de bactérias Gram negativas e Gram positivas, poucos estudos envolvendo a caracterização mais detalhada destas substâncias produzidas por anaeróbios obrigatórios, como *Parabacteroides*, estão disponíveis na literatura. Além disso, pouco se sabe sobre a importância ecológica das bacteriocinas sintetizadas por amostras deste gênero.

O conhecimento das atividades antagonistas dos microrganismos pode contribuir para elucidar as complexas relações intermicrobianas em ecossistemas diversos. Além da relevância ecológica, o surgimento de novas perspectivas quanto ao emprego de bactérias produtoras de bacteriocinas como probióticos e de bacteriocinas para fins terapêuticos, contra infecções bacterianas, ou na indústria, para conservação de alimentos, também demonstra a importância do estudo das bacteriocinas. Assim, considerando-se a relevância do tema e a escassez de trabalhos relativos à produção de substâncias antagonistas tipo

bacteriocinas por *P. distasonis*, especialmente a aparente ausência de dados referentes à extração, caracterização e purificação de bacteriocina, desenvolvemos este estudo.

3 OBJETIVOS

5 3.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar, extrair, caracterizar e purificar substâncias antagonistas tipo bacteriocina produzida por amostra de *P. distasonis* isolada de frango de corte.

10

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

15

- Investigar a produção de substâncias antagonistas tipo bacteriocina por amostras de *P. distasonis*, avaliando-se a expressão de autoantagonismo, isoantagonismo e heteroantagonismo.

20

- Avaliar o espectro de ação antagonista de uma amostra de *P. distasonis* selecionada.

- Extrair as proteínas das frações intracelulares e extracelulares da amostra de *P. distasonis* selecionada.

- Titular a atividade antagonista e dosar as proteínas das frações ativas obtidas.

25

- Otimizar as condições de cultivo da amostra produtora.
- Caracterizar uma das frações proteicas, avaliando o efeito de diferentes temperaturas, pH, solventes orgânicos e enzimas proteolíticas na sua atividade.

- Avaliar o modo de ação da fração selecionada.

30

- Purificar a substância antagonista presente na fração selecionada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

5 4.1 AMOSTRAS MICROBIANAS

Para avaliação da expressão de atividade heteroantagonista, isoantagonista e autoantagonista, definidas como inibição de bactérias de espécies distintas, da mesma espécie e do mesmo clone, foram estudadas 78 amostras de *P. distasonis*, denominadas amostras teste. Todas foram recuperadas de espécimes fecais de frangos de corte, durante investigação previamente realizada no nosso Laboratório (GARCIA *et al.*, 2012).

Como reveladoras, foi empregado um painel de amostras de leveduras e bactérias de referência, anaeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas e aeróbias, Gram negativas e Gram positivas, além das amostras teste e de 93 amostras de *Bacteroides* também isoladas de espécimes fecais de frangos de corte (GARCIA *et al.*, 2012) (Quadro 1). A partir dos dados gerados por esta triagem, foram selecionadas uma amostra produtora, a amostra P15, e uma amostra reveladora, *P. distasonis* ATCC1295, a serem utilizadas nas etapas posteriores da investigação.

A atividade da amostra produtora selecionada também foi avaliada empregando-se, como reveladoras, amostras relevantes do ponto de vista clínico, agentes de enterite aguda e amostras de *Parabacteroides distasonis* e *Bacteroides* spp. isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal (SANTOS *et al.*, 2003; Quadro 1)

Quadro 1. Amostras reveladoras utilizadas para a pesquisa da atividade antagonista de amostras de *Parabacteroides distasonis* isoladas de frango de corte pelo método da sobrecamada.

Pesquisa de atividade de:				
78 amostras teste			<i>P. distasonis</i> P.15	
Bactérias			Bactérias	
Gram positivas			Leveduras	
Gram negativas				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	
<i>Streptococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Cryptococcus gatii</i> ATCC 24065	<i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	<i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 25286	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 62066	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19435	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> FDC Y4		<i>P. distasonis</i> ^c (n = 10)	
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919	<i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834		<i>Bacteroides</i> spp. ^{c,d} (n = 24)	
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Porphyromonas gingivalis</i> FD 381			
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611			
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33569			
<i>Actinomyces israelii</i> ATCC 12102	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285			
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10557	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482			
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 9927	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741			
	<i>P. distasonis</i> ATCC 1295			
	<i>P. distasonis</i> ^a (n = 78)			
	<i>Bacteroides</i> spp. ^{ab} (n = 93)			

^a, amostras isoladas de frango (Garcia et al., 2012); ^b, *B. fragilis*; *B. vulgatus*; *B. ovatus* e *B. stercoris*; ^c, amostras isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal (Santos et al., 2003); ^d, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *B. ovatus*, *B. caccae*, *B. capillosus* e *B. thetaiotaomicron*.

As amostras bacterianas incluídas no estudo pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e
5 vêm sendo conservadas em freezer -86 °C, em *Brucella Broth*¹ acrescido de glicerol² na concentração final de 10%. As amostras bacterianas foram cultivadas em BHIA³ suplementado com 0,5% de extrato de levedura⁴, 0,1% de hemina⁵ e 0,1% de menadiona⁶ (BHIA-S), a 37 °C. A incubação foi realizada por 24 h (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* e *E. coli*) ou 48 h (todas as demais), em
10 atmosfera adequada para a multiplicação de cada bactéria empregada [aerobiose (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. Typhimurium*), microaerofilia (*Streptococcus*, *A. actinomycetemcomitans* e *Campylobacter*) ou anaerobiose (todas as demais)]. Atmosfera de microaerofilia e de anaerobiose foram obtidas pela incubação em
15 jarra de anaerobiose⁷, empregando o método da vela, para obtenção de microaerofilia, e método mecânico (90% N₂ e 10% CO₂) ou químico⁸ para obtenção de anaerobiose.

A amostra de *Candida albicans* e as amostras de *Cryptococcus* spp. foram gentilmente cedidas pelos Professores Jacques Robert Nicoli e Maria Aparecida
20 de Resende Stoianoff, responsáveis pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos e Laboratório de Micologia, respectivamente. As leveduras foram cultivadas em Ágar Sabouraud (1% de peptona⁹, 0,5% de extrato de levedura, 2% de glicose¹⁰, 1,5% de ágar¹¹) a 37 °C, por 48 h, em aerobiose.

¹ BBL, Sparks, MD, EUA

² Ecibra, Santo Amaro, SP, Brasil

³ Difco, Sparks, MD, EUA

⁴ Difco

⁵ Inlab, São Paulo, SP, Brasil

⁶ Inlab

⁷ Forma Scientific, Marietta, OH, EUA

⁸ Gaspak EZ Anaerobe Container System; BD, Sparks, MD, EUA

⁹ Difco

¹⁰ Inlab

¹¹ Difco

4.2 PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA

A expressão de atividade antagonista foi avaliada pelo método de sobrecamada (BOOTH *et al.*, 1977), utilizando 200 diferentes microrganismos e 21 diferentes gêneros, amostras reveladoras. As amostras teste foram cultivadas em BHI¹²suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de hemina e 0,1% de menadiona(BHI-S; HOLDEMAN *et al.*, 1977), pH 7,2 a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose e, posteriormente, inoculadas em *spots* equidistantes, em BHIA-S, pH 7,2, utilizando-se replicador de Steers. Após incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose, as células foram mortas por exposição a vapor de clorofórmio¹³por 30 min. As placas foram entreabertas por 30 min para evaporação do clorofórmio residual e, então, foram vertidos sobre a cultura 3,5 mL de BHIA-S semissólido (0,7% de ágar) inoculado com a amostra reveladora (150 µL de cultura de bactéria anaeróbia obrigatória e *A. actinomycetemcomitans* e 10 µL das demais) ou 3,5 mL de Ágar *Sabouraud* semissólido (0,7% de ágar) inoculado com 50 µL de cultura da levedura. O material foi incubado nas condições de cultivo adequadas para cada amostra reveladora utilizada. A seguir, a leitura foi realizada avaliando-se a presença de halos de inibição da amostra reveladora em torno dos *spots* das amostras teste.

A partir desta etapa, foi empregada no estudo apenas a amostra produtora selecionada (P15), para a caracterização da atividade antagonista. Para as etapas de extração, caracterização e purificação da substância antagonista, a amostra *P. distasonis* ATCC 1295 foi selecionada como reveladora, com base nos resultados da pesquisa de atividade antagonista, como a visibilidade e tamanho do halo.

¹² Difco

¹³ Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

4.3 DETECÇÃO DE FATORES DE INTERFERÊNCIA

5 Para averiguar se a inibição observada é devida à produção de substância tipo bacteriocina ou a outros possíveis fatores, foram realizados os testes descritos a seguir.

4.3.1 BACTERIÓFAGOS

10

Para avaliar a presença de fagos, que poderiam ser responsáveis pela atividade antagonista, foi retirado, assepticamente, um fragmento de ágar da zona de inibição da multiplicação da amostra reveladora. O fragmento removido foi macerado em solução salina pH 7,2 e centrifugado a 23.400 xg por 20 min. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para 3 mL de cultura em meio BHI-S contendo a amostra reveladora. Após incubação por 10 min, à temperatura ambiente, para permitir a adsorção viral à amostra reveladora, uma alíquota de 200 µL foi adicionada a 3,5 mL de BHI-S semissólido, que foi vertido sobre uma camada de meio BHIA-S. O material foi novamente incubado a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose e avaliado quanto à presença de zonas líticas, indicativas da presença de bacteriófagos (TURNER & JORDAN, 1981).

20

4.3.2 ÁCIDOS GRAXOS

25

A avaliação da possível inibição por ácidos graxos foi realizada empregando-se BHIA-S com e sem adição de 1% de amido solúvel¹⁴ para pesquisa de atividade antagonista (WALSTAD *et al.*, 1974). Foi avaliada a presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora.

30

¹⁴ Reagen, Curitiba, PR, Brasil

4.3.3 CLOROFÓRMIO

Para avaliar a possibilidade de interferência da presença de resíduo de clorofórmio na multiplicação da amostra reveladora, foi realizado o seguinte teste.

5 A amostra produtora foi inoculada, em *spot*, na superfície de BHIA-S e, após incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose, a amostra reveladora, previamente cultivada em BHI-S, foi inoculada em torno do *spot* da amostra produtora, em forma de cruz, sem que o crescimento da amostra produtora fosse tocado. O material foi incubado a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose e, então, foi avaliada a
10 presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora (FARIAS *et al.*, 1992).

4.3.4 H₂O₂

15

A produção de H₂O₂ foi investigada através da incorporação de catalase de fígado ¹⁵ 0,03% p/v em BHI-S. Como controle, foi empregado o mesmo meio sem a adição da enzima. A presença de halo de inibição da multiplicação da amostra reveladora apenas no meio sem adição de catalase foi considerada indicativa de
20 que a atividade antagonista deve-se à presença de H₂O₂ (HAMADA & OOSHIMA, 1975).

25 4.4 EXTRAÇÃO PROTEICA

A partir da indicação de atividade antibacteriana decorrente da síntese de substância tipo bacteriocina, foi realizada a extração proteica, segundo protocolo
30 proposto por Green & Huges (1955), com algumas adaptações. A amostra produtora foi cultivada em 800 mL de BHI-S, pH 8,0, a 37 °C, em anaerobiose.

¹⁵Reagen

Após 48 h, a cultura foi centrifugada a 12.520 g, a 4 °C, por 30 min. O sobrenadante foi empregado para extração das frações extracelulares e o precipitado para obtenção das frações intracelulares.

O sobrenadante coletado foi submetido à precipitação proteica pela adição de concentrações crescentes de sulfato de amônio¹⁶ (30, 50 e 80%), em agitação constante, a 4 °C, até a solubilização do sal. Após centrifugação a 23.741 g, a 4 °C, por 30 min, o precipitado foi dissolvido em 10 mL de Tris¹⁷-HCl¹⁸ 0,01 M, pH 8,0, e dialisado (Spectra/Por Membrane 1000 MW)¹⁹ contra o mesmo tampão, em câmara fria, *overnight*, com três trocas de tampão. As frações extracelulares obtidas foram denominadas S30, S50 e S80.

As células (*pellet*) foram lavadas três vezes em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, suspendidas em 15mL do mesmo tampão e sonicadas²⁰ por 20 ciclos de 40 s, a 50 W, com intervalos de 40 s, em banho de gelo. A lise celular foi confirmada por microscopia óptica após coloração pelo método de Gram. O extrato foi centrifugado a 29.829 g, a 4 °C, por 30 min. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com sulfato de amônio (30, 50 e 80%) e as frações intracelulares geradas foram denominadas C30, C50 e C80.

Os extratos extracelulares e intracelulares obtidos foram esterilizados por filtração (Millex GP²¹, poro de 0,22 µm).

4.5 TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Para titulação da atividade antagonista, os extratos proteicos foram submetidos a diluições sucessivas em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, e teste

¹⁶ Vetec

¹⁷ Inlab

¹⁸ Quimex, São Paulo, SP, Brasil

¹⁹ Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, EUA

²⁰ Branson, Danbury, CT, EUA

²¹ Millipore, Bedford, MA, EUA

para avaliação da expressão de antagonismo pelo método de sobrecamada. Uma alíquota de 20 µL dos extratos proteicos não diluídos e diluídos foi gotejada sobre a superfície de BHIA-S. Após absorção do inóculo, 3,5 mL de BHIA-S semissólido previamente adicionado de uma alíquota de 150 µL de cultura de *P. distasonis* ATCC 1945 foram vertidos sobre camada de BHIA-S. Após solidificação do meio, a placa foi incubada a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. O título, expresso em unidades arbitrárias de atividade antibacteriana por mililitro (UA/mL), foi definido como a recíproca da maior diluição que originou uma zona límpida de inibição da multiplicação da amostra reveladora (YAMAMOTO *et al.*, 2003). Alíquotas das frações ativas foram mantidas em freezer a -86 °C.

4.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES ATIVAS

15

A determinação da concentração de proteínas nos extratos ativos foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (1976). Solução de soroalbumina bovina²² (1 mg/mL) foi utilizada como padrão. A leitura foi realizada em leitor de Elisa (MultiskanSpectrum)²³.

20

A fração C50 foi selecionada para emprego nas etapas posteriores do estudo.

²² Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

²³ Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

4.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA AMOSTRA PRODUTORA

5 Diferentes condições de cultivo foram testadas para determinação daquelas mais favoráveis à expressão de antagonismo. A amostra produtora P15 foi cultivada em BHI-S, a 37 °C, em anaerobiose. Como parâmetros variáveis, foram avaliados: a) tempo de incubação, 24 ou 48 h; b) submissão ou não a estresse oxidativo (O₂ e H₂O₂); e c) cultivo da amostra produtora acrescida ou não da amostra reveladora (*P. distasonis* ATCC 1295) previamente morta por tratamento térmico.

A indução de estresse oxidativo pela exposição ao oxigênio molecular foi realizada segundo Silva *et al.* (2005), com algumas modificações. A amostra produtora foi cultivada em 800 mL de BHI-S, pH 8,0, a 37 °C, em anaerobiose, por 12 h; em aerobiose, sob agitação (140 rpm), por 8 h; e, posteriormente, novamente em anaerobiose, até completar 48 h de cultivo. O estresse com H₂O₂²⁴ foi realizado utilizando protocolo descrito por Rocha & Smith (1997), com algumas modificações. A amostra produtora foi cultivada em 800 mL de BHI-S, pH 8,0, a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose, e alíquotas de 50 µL, 100 µL e 150 µL de H₂O₂ foram adicionadas durante este período, após incubação por 8 h, 20 h e 32h, respectivamente.

A cultura da amostra produtora também foi realizada na presença da reveladora previamente inativada por tratamento térmico. Após o cultivo da amostra reveladora em 800 mL de BHI-S, pH 8,0, a 37 °C, em anaerobiose, por 48 h, a cultura foi autoclavada a 121 °C, por 30 min e, posteriormente, centrifugada a 12.520 g, a 4 °C, por 30 min. O *pellet* foi solubilizado em BHI-S, que foi adicionado à cultura da bactéria produtora (BENITEZ *et al.*, 2011).

Extração proteica, como descrita no item 4.4, foi realizada posteriormente a cada procedimento de cultivo, para obtenção da fração C50.

²⁴Vetec

A partir destes resultados o estresse oxidativo foi escolhido para os testes subsequentes.

5 4.8 CARACTERIZAÇÃO DE C50

10 A fração C50 foi submetida a diferentes tratamentos visando à avaliação do efeito dos mesmos na atividade antagonista. Foram testados diferentes valores de temperatura e pH, solventes orgânicos e enzimas proteolíticas. Após os tratamentos, os extratos foram submetidos a testes de atividade antagonista como descrito no item 4.5.

15 4.8.1 TEMPERATURA

Para avaliação da interferência de tratamento térmico na atividade antagonista da fração C50, foi utilizada a metodologia descrita por Ribeiro-Ribas *et al.* (2009), com algumas adaptações.

20 Alíquotas de C50 foram diluídas na proporção 1:1 (v/v) em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, e incubadas a -80 °C (*freezer*) -20 °C (*freezer*), 4 °C (geladeira), 25 °C (temperatura ambiente), 37 °C (estufa), 50 °C, 70 °C e 100 °C (banho-maria) em intervalos de 10, 20 e 40 min, 1, 2, 4 e 8 h, 1, 2, 8, 22, 30 e 50 dias, 6 e 12 meses. Como controle, foi utilizado o extrato diluído sem qualquer tratamento
25 térmico.

4.8.2 PH

30 Para avaliação da estabilidade da atividade antagonista frente a diferentes valores de pH, foi utilizada metodologia descrita por Valeff (2011), com algumas adaptações. O tampão universal Britton-Robinson (BRITTON & ROBINSON,

1931; ácido orto-fosfórico²⁵ 0,04 M, ácido acético²⁶ 0,04 M e ácido bórico²⁷ 0,04 M), que possibilita o ajuste do pH a valores de 2 a 12, foi utilizado. O ajuste do pH foi feito com solução de NaOH 2 M e HCl 2 M e os tampões foram esterilizados por filtração em Millex GP (0,22 µm).

5 C50 foi diluído na proporção de 1:1 (v/v) no tampão universal e a solução foi, então, incubada a 37 °C, em intervalos de 15 e 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h, 1, 2 3, 6, 10, 20 e 30 dias. Como controle, foi verificada a atividade do tampão e da fração diluída em Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, na proporção de 1:1 (v/v), incubados na mesma condição empregada para os tubos teste.

10

4.8.3 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

O efeito de enzimas proteolíticas²⁸ na fração C50 foi testado segundo 15 metodologia descrita por Apolônio *et al.* (2008). Foram utilizadas proteinaseK, α-quimotripsina, tripsina, papaína e pepsina. As enzimas α-quimiotripsina e tripsina foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, a proteinase K em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, a papaína em tampão fosfórico²⁹ 50 mM, pH 5,0, e a pepsina em tampão citrato³⁰ 100 mM, pH 3,0, todas na concentração final de 20 1 mg/mL. O material foi esterilizado por filtração.

As soluções foram preparadas diluindo-se as alíquotas do extrato em cada uma das soluções enzimáticas na proporção de 1:1 (v/v). O produto foi incubado por 15 min, 30 min e 1 h, a 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, a atividade antagonista foi testada, como descrito no item 4.5, e os resultados foram 25 expressos em UA/mL.

Como controles foi verificada a atividade das soluções enzimáticas e do extrato diluído 1:1 (v/v) em Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, e em Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, incubados por 15 min, 30 min e 1 h, na temperatura de 37 °C.

²⁵ Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²⁶ Ecibra

²⁷ BioAgency, São Paulo, SP, Brasil

²⁸ Sigma-Aldrich

²⁹ Inlab

³⁰ Inlab

4.8.4 SOLVENTES ORGÂNICOS

Para verificar o efeito de solventes orgânicos na atividade antagonista de C50, foi empregada metodologia descrita por Apolônio *et al.* (2008). Os solventes utilizados foram acetona³¹, acetonitrila³², álcool iso-propílico³³, butanol³⁴, etanol³⁵, hexano³⁶ e metanol³⁷.

Soluções aquosas a 10% dos solventes orgânicos foram preparadas e, em seguida, filtradas em Millex GP (0,22 µm). Os extratos foram diluídos na proporção de 1:1 (v/v) nestas soluções e, então, incubados a 25 °C, por 30 min, por 1 h e 2 h. Foram realizados controles, utilizando as soluções aquosas dos solventes orgânicos e o extrato diluído 1:1 (v/v) em Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, incubados a 25 °C, pelos mesmos intervalos de tempo dos tubos teste.

4.9 ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DE C50

4.9.1 CIM

A CIM é definida como a menor concentração da droga que inibe o crescimento visível de um organismo após incubação (LEVISON & LEVISON, 2009). Este período de incubação, entretanto, é estendido em testes realizados com microrganismos anaeróbios, que necessitam de maior tempo para multiplicação (CLSI, 2012). Para a determinação da CIM, foi utilizado o protocolo preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012), com algumas

³¹ Fmaia, Cotia, SP, Brasil

³² J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, EUA

³³ Vetec

³⁴ Ecibra

³⁵ Labsynth, Diadema, SP, Brasil

³⁶ Ecibra

³⁷ J.T.Baker

modificações, por meio de microdiluição em caldo. O experimento foi realizado em triplicata.

Para esta avaliação, 2 µL de cultura da amostra reveladora foram adicionados em cada poço de uma microplaca de 96 poços, com o inóculo previamente ajustado com salina 0,85% conforme escala 0,5 de Mac Farland, sendo que a concentração final bacteriana em cada poço foi de 10^6 UFC/mL. Também foram adicionados 100 µL de diferentes concentrações dos extratos ativos, além de 98 µL de BHI-S. Como controle positivo, foi empregada mistura de 198 µL de BHI-S e 2 µL de cultura da amostra reveladora e, como controle negativo, foram utilizados 98 µL de BHI-S, 100 µL de solução de extrato e 2 µL de salina. Após 48 h de incubação, foi realizada a leitura do teste para determinação da CIM, expressa em UA/mL.

4.9.2 CBM

A CBM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9% (LEVISON & LEVISON, 2009).

Este experimento foi realizado a partir da microplaca empregada para determinação da CIM, também em triplicata. Alíquotas de 100 µL do controle negativo e de cada poço em que não houve crescimento bacteriano foram semeadas em BHIA-S com o auxílio de alça de Drigalski. O controle positivo foi diluído em BHI-S (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5}) e 100 µL de cada diluição também foram semeados em BHIA-S. As placas foram incubadas em anaerobiose, a 37 °C, por 48 hs. Após incubação, foi realizada a contagem de colônias e o resultado foi expresso em UFC/mL.

4.10 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ATIVO - CROMATOGRAFIA

A fração ativa C50 foi submetida a etapas sucessivas de cromatografia para purificação da substância ativa. Após cada etapa de purificação, as frações foram submetidas a teste de atividade antagonista, como descrito no item 4.5.

Inicialmente, foi empregada cromatografia por troca iônica (FPLC), em coluna Mono-QTM 5/50 GL Tricorn^{TM38}, previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, e eluída no mesmo tampão acrescido de NaCl 1 M, em gradiente linear de 0-100%. As frações obtidas foram concentradas por liofilização, solubilizadas em 100 µL de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, e testadas quanto à expressão de atividade antagonista, conforme descrito no item 4.5.

As frações provenientes da cromatografia por troca iônica que apresentaram atividade antagonista foram submetidas a cromatografia por gel filtração (FPLC), em coluna de Superose 12 HR 10/30³⁹, previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, acrescido de 0,2 M de NaCl, e eluídas no mesmo tampão. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h, liofilizadas, solubilizadas em 100 µL de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, e testadas conforme descrito no item 4.5.

As frações ativas obtidas da etapa de purificação anterior foram submetidas a cromatografia de fase reversa (HPLC) em coluna C18⁴⁰ (4,6 mm de diâmetro x 25 cm de comprimento) equilibrada com solução A (TFA⁴¹ 0,05% v/v em água Milli-Q[®]) e eluídas com solução B (acetonitrila⁴² 100% + TFA 0,05%). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 280 e 220 nm. As frações obtidas foram concentradas por liofilização e solubilizadas em 10 µL de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, e testadas quanto à expressão de antagonismo (item 4.5).

³⁸ GE Healthcare, Uppsala, Suécia

³⁹ GE Healthcare

⁴⁰ Shimadzu, Kyoto, Japão

⁴¹ Sigma-Aldrich

⁴² Merck

4.11 SDS-PAGE

Os *pools* das frações ativas provenientes de cada etapa de purificação foram submetidos a SDS-PAGE (17,5%) e separados a 80 V, por 3 h. Após a separação, o gel foi lavado durante 3 h com água destilada estéril, para remoção do SDS e de possíveis contaminantes microbianos e, em seguida, encaminhado para a revelação de atividade *in situ*. O gel, mantido em condições assépticas, foi depositado sobre camada de BHIA-S e recoberto com uma camada de BHI-S semissólido contendo uma alíquota de cultura de *P. distasonis* ATCC 1295. Após incubação a 37 °C, em anaerobiose, a leitura foi realizada pela observação da presença de linhas de inibição da multiplicação da amostra reveladora na posição das bandas proteicas. A massa molecular de cada banda ativa foi estimada por comparação com padrão de proteínas pré-corado⁴³ (FARIAS *et al.*,1994).

4.12 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A massa molecular da proteína purificada que apresentou atividade antagonista foi avaliada por meio de espectrometria de massas. A amostra foi dissolvida em ácido sinápico saturado (5 mg de solução aquosa de 3% TFA:acetonitrila:água, 1:4:5, v/v), na proporção de 1:3 (v/v), transferida (0,5 µL/*well*), em triplicata, para aquisição da placa de dados MALDI (MTP AnchorChips 384 x 600)⁴⁴ e mantida em temperatura ambiente. A massa molecular foi determinada empregando-se AutoflexTM III MALDI-TOF/TOF⁴⁵, operando em modo linear positivo. A calibração linear foi obtida utilizando padrão de calibração proteico (Protein Calibration Standard II)⁴⁶.

⁴³ Promega

⁴⁴ Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA

⁴⁵ Bruker Daltonics

⁴⁶ Bruker Daltonics

5 RESULTADOS

5 5.1 PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA

De um total de 15.600 testes de antagonismo realizados, 571 geraram resultados positivos e 39 das 78 amostras exibiram atividade antagonista. O espectro de ação variou muito entre as amostras, sendo detectada a expressão de heteroantagonismo, isoantagonismo e autoantagonismo. Isoantagonismo foi o fenômeno mais frequente, observado para 39 das 78 (50,0%) amostras de *P. distasonis* (FIG. 2). Nove (11,5%) amostras expressaram heteroantagonismo e atividade autoantagonista foi exibida por apenas duas amostras (2,6%).

No que diz respeito ao espectro de ação, atividade foi observada somente contra bactérias Gram negativas, principalmente grupos filogeneticamente relacionados, com exceção de *F. necrophorum* e *A. actinomycetemcomitans*. Não se observou antagonismo contra bactérias Gram positivas nem atividade antifúngica nas condições testadas. Entre as amostras de referência utilizadas, *P. distasonis*, *B. vulgatus* e *B. thetaiotaomicron* foram as mais frequentemente inibidas, mostrando suscetibilidade a nove (11,5%), nove e oito (10,3%) amostras, respectivamente (FIG. 3).

Um total de 76 (97,4%) amostras de *P. distasonis* apresentou sensibilidade a pelo menos uma amostra produtora. No que se refere às amostras de *Bacteroides* isoladas de fezes de frangos, todas as 93 apresentaram suscetibilidade a pelo menos uma amostra produtora.

A amostra produtora denominada P15 foi aquela que expressou antagonismo mais frequentemente. Ainda, P15 exibiu espectro de inibição mais amplo (FIG. 4) e halos mais visíveis e límpidos. Assim, a amostra P15 foi selecionada para as fases subsequentes do estudo.

5



10

Figura 2. Atividade isoantagonista de amostras de *Parabacteroides distasonis* isoladas de frango de corte. Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37°C, por 48 h, em anaerobiose. Amostras produtoras: P15 e P25, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

15

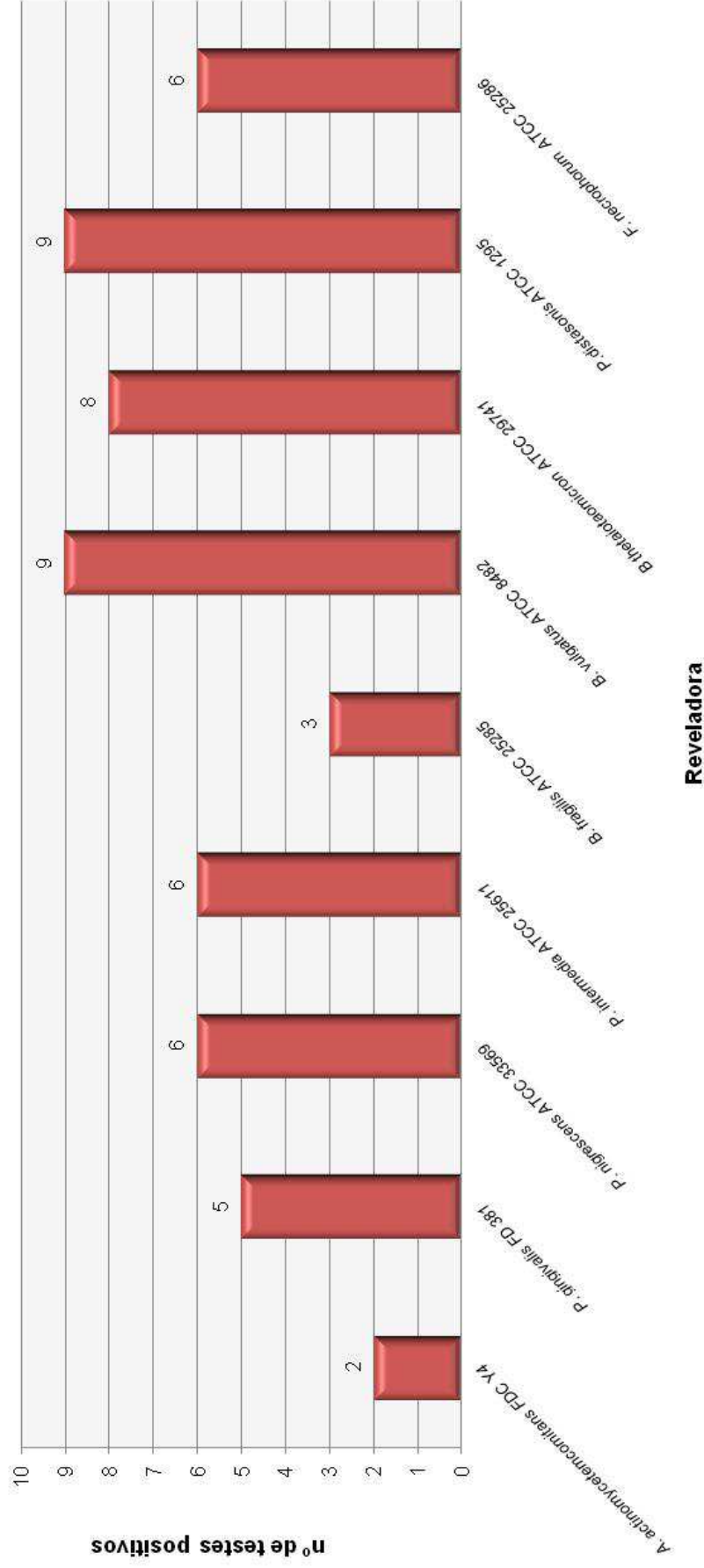


Figura 3. Espectro de atividade antagonista (heteroantagonismo e isoantagonismo) de 78 amostras de *Parabacteroides distasonis* isoladas de frangos de corte. Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose.

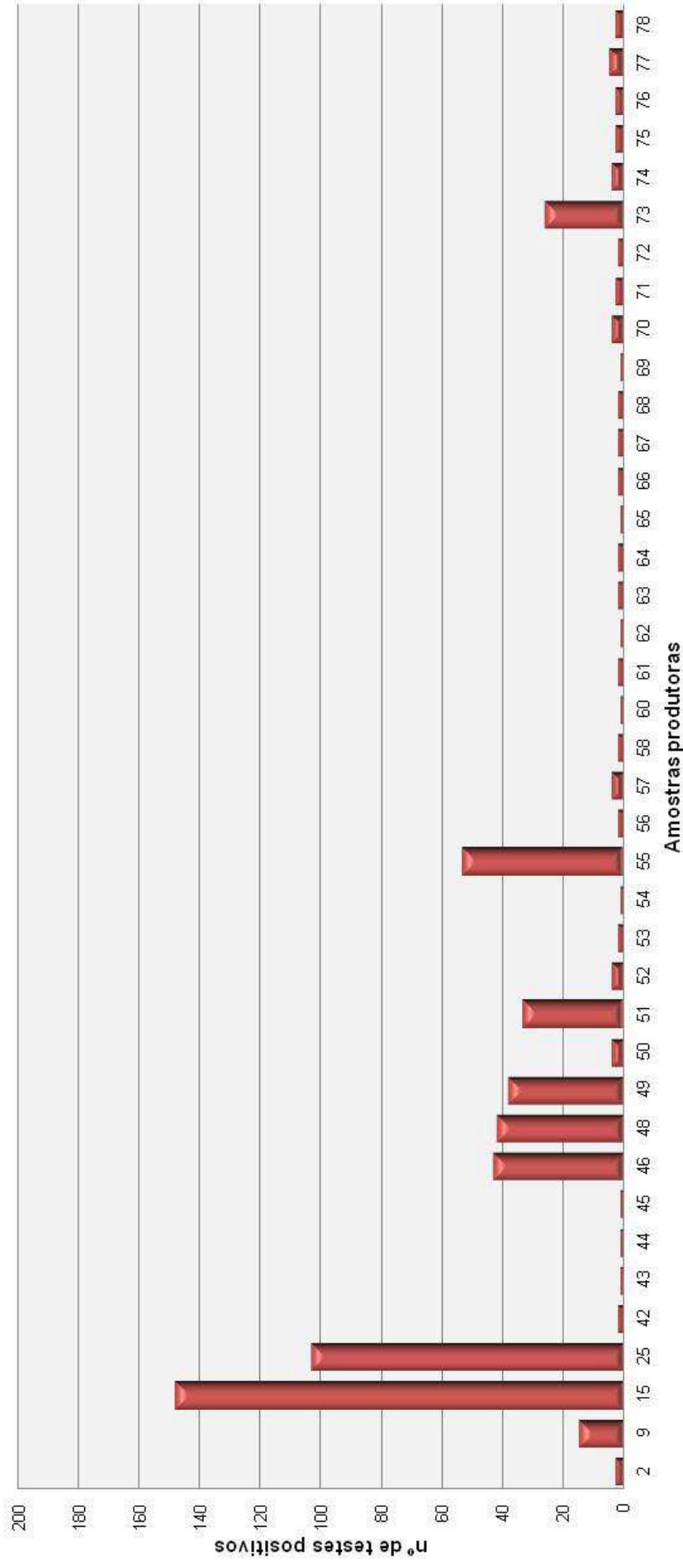


Figura 4. Atividade antagonista de amostras de *Parabacteroides distasonis* (1 a 78) isoladas de frangos de corte contra 200 amostras reveladoras [amostras teste, *Bacteroides* isolados de frango e amostras de referência (bactérias Gram negativas, Gram positivas e leveduras)]. Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, tempo e atmosfera adequados para cada reveladora.

5.2 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO DA AMOSTRA PRODUTORA

5 Quando a ação antagonista da amostra produtora selecionada foi avaliada empregando-se, como reveladoras, *Campylobacter*, *S. Typhimurium* e amostras de *Bacteroidese P. distasonis* isolados de pacientes com infecção intra-abdominal, observou-se antagonismo apenas contra *Parabacteroides* e *Bacteroides*, grupo filogeneticamente relacionado à amostra produtora (FIG. 5).
10 Apenas uma amostra de *B. fragilis*, isolada de paciente com infecção intra-abdominal, não se mostrou suscetível.

15 5.3 FATORES DE INTERFERÊNCIA

5.3.1 BACTERÍÓFAGOS

20 Não foram evidenciadas zonas de lise decorrentes da presença de bacteriófagos no teste realizado (FIG. 6).

5.3.2 ÁCIDOS GRAXOS

25 A adição de amido ao meio de cultivo não impediu a expressão de antagonismo pela amostra P15, indicando que ácidos graxos não eram responsáveis pelo antagonismo (FIG. 6).

5



10

Figura 5. Atividade heteroantagonista da amostra de *Parabacteroides distasonis*P15, isolada de frango de corte. Método de sobre-camada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Amostra reveladora: *Bacteroides fragilis* isolada de paciente com infecção intra-abdominal.

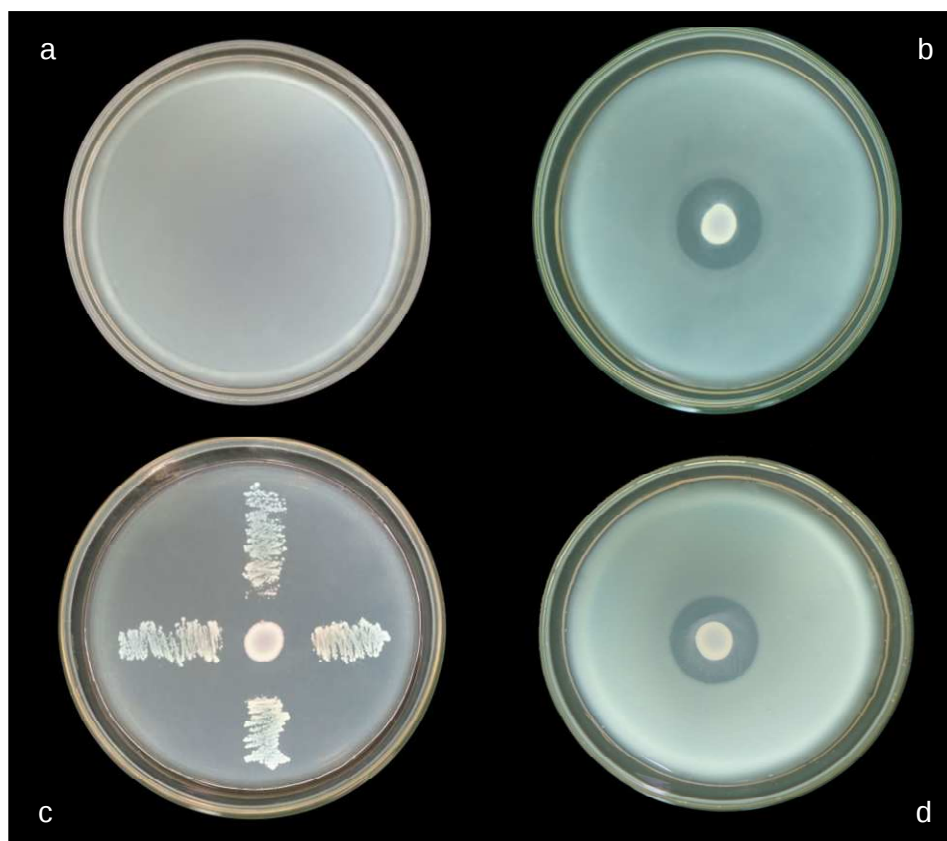
15

5

10

15

20



25

Figura 6. Testes para pesquisa de fatores de interferência. Avaliação da atividade de: a) bacteriófagos, b) ácidos graxos, c) clorofórmio e d) H_2O_2 . Método de sobrecamada, meio BHIA-S, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

5.3.3 CLOROFÓRMIO

Os resultados dos testes para pesquisa de atividade antagonista com ou sem adição de clorofórmio foram similares, indicando que esta substância não é a responsável pela inibição da amostra reveladora (FIG. 6).

5.3.4 H₂O₂

A adição de catalase ao meio de cultivo não inibiu a expressão de antagonismo, demonstrando que a produção de H₂O₂ não é responsável pela atividade (FIG. 6).

5.4 EXTRAÇÃO PROTEICA - TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Após extração proteica da amostra P15, apenas as frações C30, C50 e S50 apresentaram atividade antagonista contra *P. distasonis* ATCC 1295. S50 apresentou maior título de atividade antagonista e maior concentração proteica. Entretanto, a fração foi mais instável que C50, perdendo sua atividade em uma semana. Assim, C50 foi selecionada para as etapas subsequentes do estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Titulação dos extratos proteicos extracelular e intracelulares de *Parabacteroides distasonis*P15 ativos contra *P. distasonis* ATCC 1295.

Extrato proteico	Título (UA/mL)	Concentração (mg/mL)
C30	nd	10,92
C50	100	29,06
S50	400	42,76

C30, fração intracelular precipitada com 30% de $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$; C50, fração intracelular precipitada com 50% de $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$; S50, fração extracelular precipitada com 50% de $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$; nd, atividade apenas do extrato não diluído.

5.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA AMOSTRA PRODUTORA

Antagonismo da fração C50 não foi detectado quando a amostra produtora foi cultivada por 24 h, enquanto que a fração C50 da cultura incubada por 48 h apresentou atividade até a diluição 1:2, com título de 100 UA/mL. O estresse oxidativo, pela exposição a O_2 , provocou um aumento do título da atividade antagonista da fração C50 para 200 UA/mL. Os demais parâmetros avaliados não interferiram na atividade antagonista (FIG. 7).

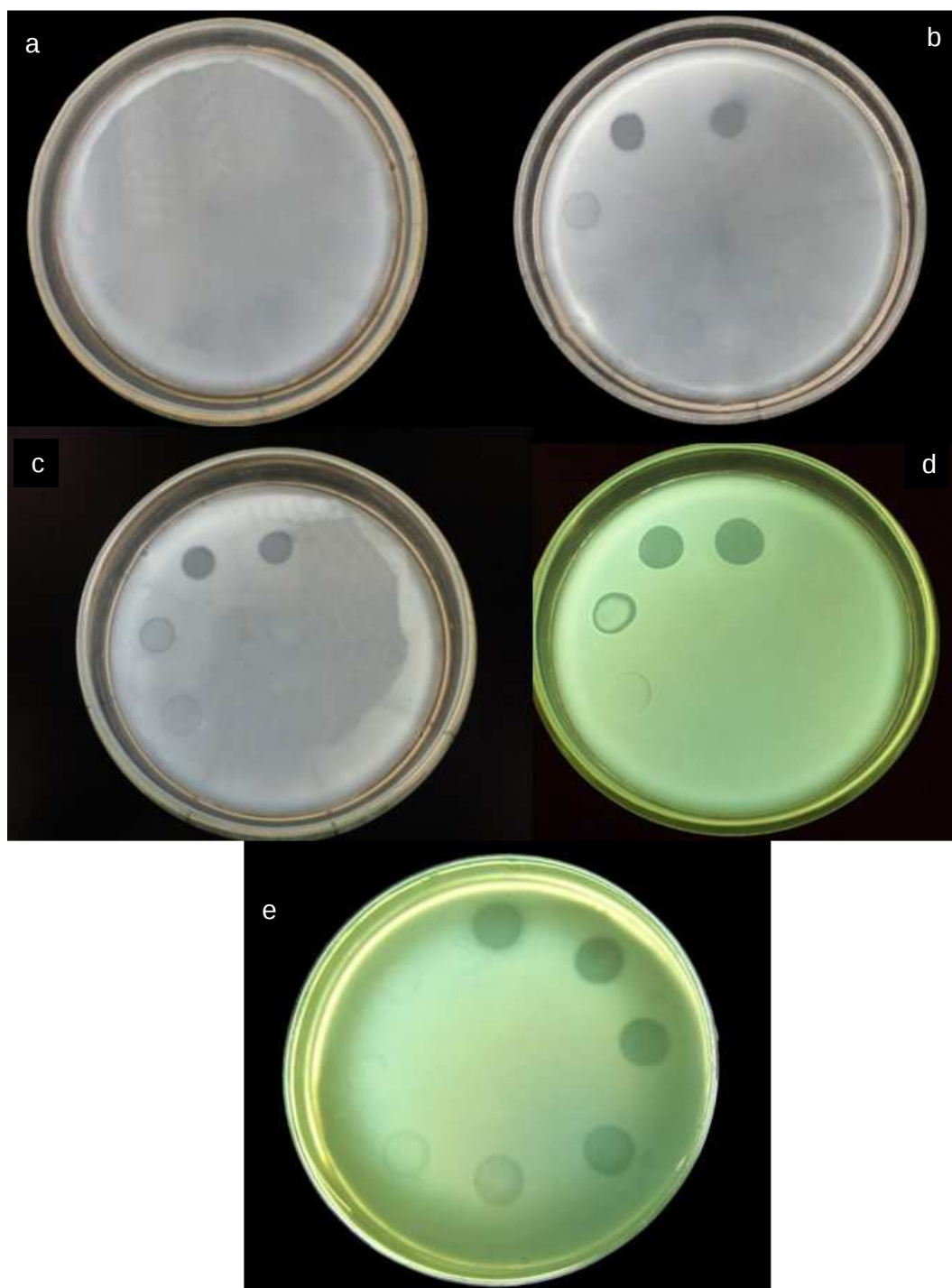


Figura 7. Titulação de C50. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. Meio de cultivo BHI-S, incubação a 37 °C, sob diferentes condições. a) 24 h e b) 48 h de incubação, c) estresse por H₂O₂, d) cultivo na presença da amostra reveladora inativada, e) estresse oxidativo.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA

5.6.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

5

A termolabilidade da fração C50 foi demonstrada pela perda completa da atividade em temperaturas superiores a 70°C, sendo que, nesta temperatura, sua estabilidade foi mantida por 20 min. C50 ainda permanece ativa após um período de 12 meses de armazenamento em temperaturas mais baixas (-20 °C e -80 °C).

10 A atividade antagonista de C50 foi preservada por 50 dias a 4 °C; por 30 dias a 25 °C, por 30 dias a 37 °C e por 4 h a 50 °C (Tabela 2).

5.6.2 INFLUÊNCIA DO PH

15

A atividade de C50 foi mantida, embora diminuída, por 6 dias, quando a fração foi submetida a valores de pH mais baixos (2,0; 3,0 e 4,0). Soluções mais alcalinas (pH 11,0 e 12,0) inativaram C50. A atividade antagonista de C50 foi mantida em 200UA/mL por 30 dias após tratamento com tampões com os demais

20 valores de pH testados. Os resultados indicam estabilidade da fração em uma ampla faixa de pH (5,0 a 10,0; Tabela 2).

5.6.3 INFLUÊNCIA DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

25

Em relação à estabilidade frente às enzimas proteolíticas, C50 foi totalmente inativado pelo tratamento com papaína, tripsina e α -quimotripsina por 15min. No que se refere a pepsina e proteinase K, a atividade do extrato C50 não diluído foi mantida por até 1h de exposição (Tabela 2). Os controles positivos

30 apresentaram atividade com título de 100UA/mL quando incubados por 15min, 30min e 1h.

Tabela 2. Influência de diferentes tratamentos sobre a estabilidade de C50 [fração intracelular precipitada com 50% de $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$].

Tratamento	Título (UA/mL)
Temperatura	
Controle	100
120°C e 100°C/10 min	0
70 °C/10min	nd
50°C/4h	100
37°C/30 dias	nd
25°C/30 dias	100
4°C/50 dias	100
-20°C e -80°C/12 meses	100
pH	
Controle	200
2, 3 e 4/6 dias	100
5 e 6/30 dias	100
7, 8, 9 e 10/30 dias	200
11 e 12/0 min	0
Enzimas (1 mg/mL, 37 °C)	
Controles	100
Tripsina/15 min	0
α -quimiotripsina/15 min	0
Papaína/15 min	0
Pepsina/1 h	nd
ProteinaseK/1 h	nd
Solventes orgânicos (10%, 25°C, 2 h)	
Controle	100
Acetona	100
Acetonitrila	100
Álcool isopropílico	100
Butanol	100
Etanol	100
Hexano	100
Metanol	100

nd, atividade apenas do extrato não diluído.

5.6.4 INFLUÊNCIA DE SOLVENTES ORGÂNICOS

A fração C50 manteve-se ativa após exposição a todos os solventes orgânicos testados. O título de atividade antagonista foi de 100 UA/mL para todos os testes e para o controle positivo (Tabela 2).

5.7 ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DE C50: DETERMINAÇÃO DA CIM E DA CBM

Os valores de CIM e CBM de C50 foram 6,25UA/mL e 160 UA/mL, respectivamente(Tabela 3 e FIG.8). Assim, a CBM foi cerca de 25 vezes maior que a CIM, o que demonstra o modo de ação bacteriostático de C50.

5.8 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO C50

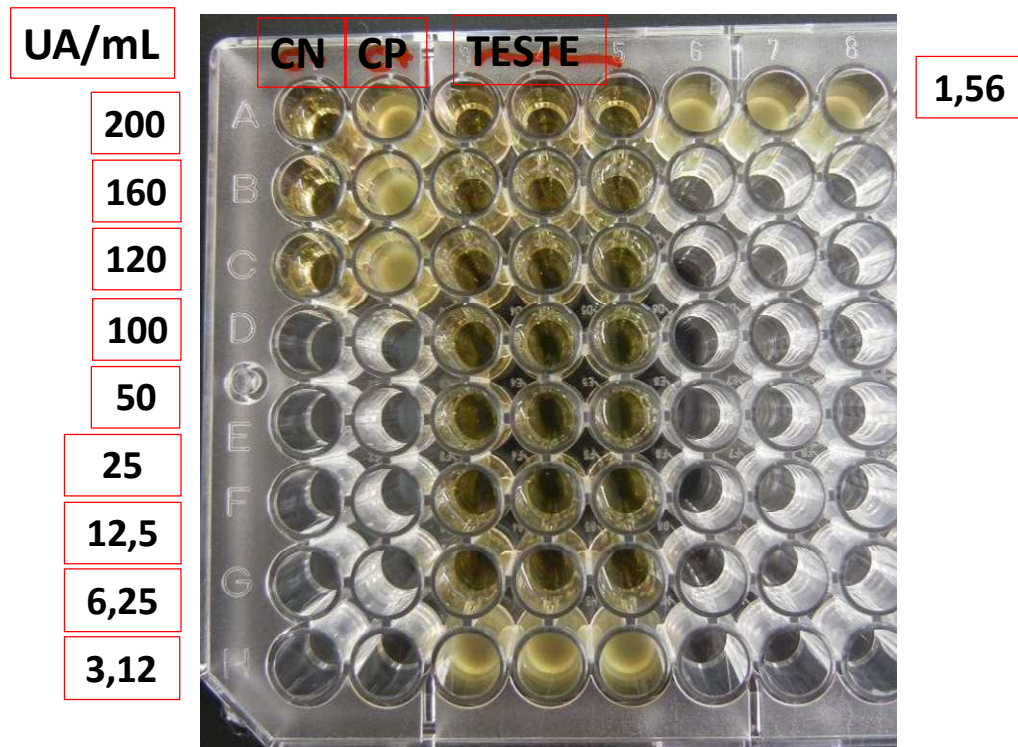
A aplicação do extrato C50 em cromatografia de troca iônica gerou 52 frações. Entre elas, as frações 1 a 4, referentes a um único pico, que não foram capazes de se ligar à coluna, e as frações 17 a 20, que foram eluídas com, aproximadamente, 20% de NaCl, apresentaram atividade antagonista (FIG. 9). O cromatograma obtido nesta etapa de purificação está representado na FIG 10.

Tabela 3. CIM e CBM de C50 (Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295).

Diluição	Título (UA/mL)	Concentração (mg/mL)	CIM	CBM
Extrato bruto	200	29,06	-	-
4:5	160	14,53	-	-
3:5	120	7,26	-	+
1:2	100	3,63	-	+
1:4	50	1,81	-	+
1:8	25	0,90	-	+
1:16	12,5	0,45	-	+
1:32	6,25	0,22	-	+
1:64	3,12	0,11	+	+
1:128	1,56	0,05	+	+

CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima; -, ausência de multiplicação bacteriana; +, presença de multiplicação bacteriana.

5

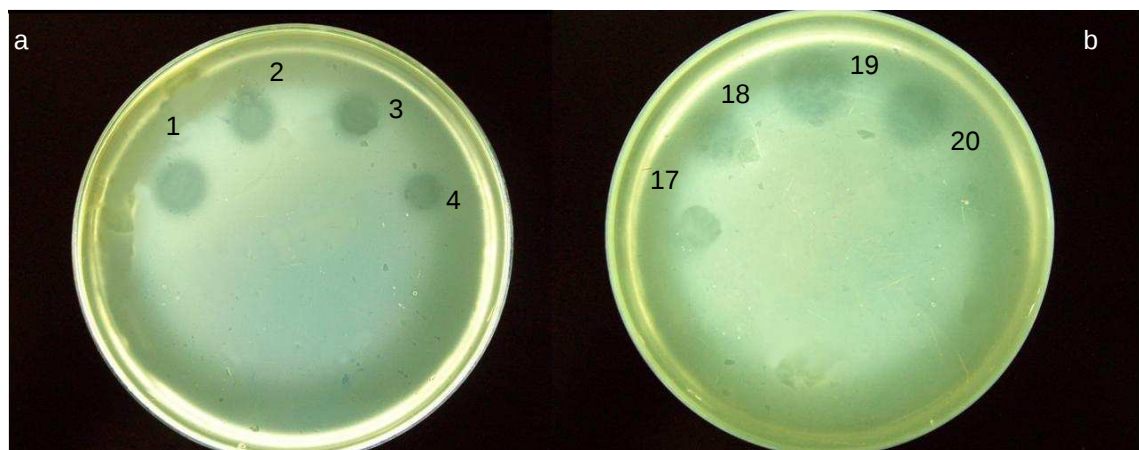


10

Figura 8. Determinação da CIM de C50 (título em UA/mL). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295. CN, controle negativo; CP, controle positivo.

15

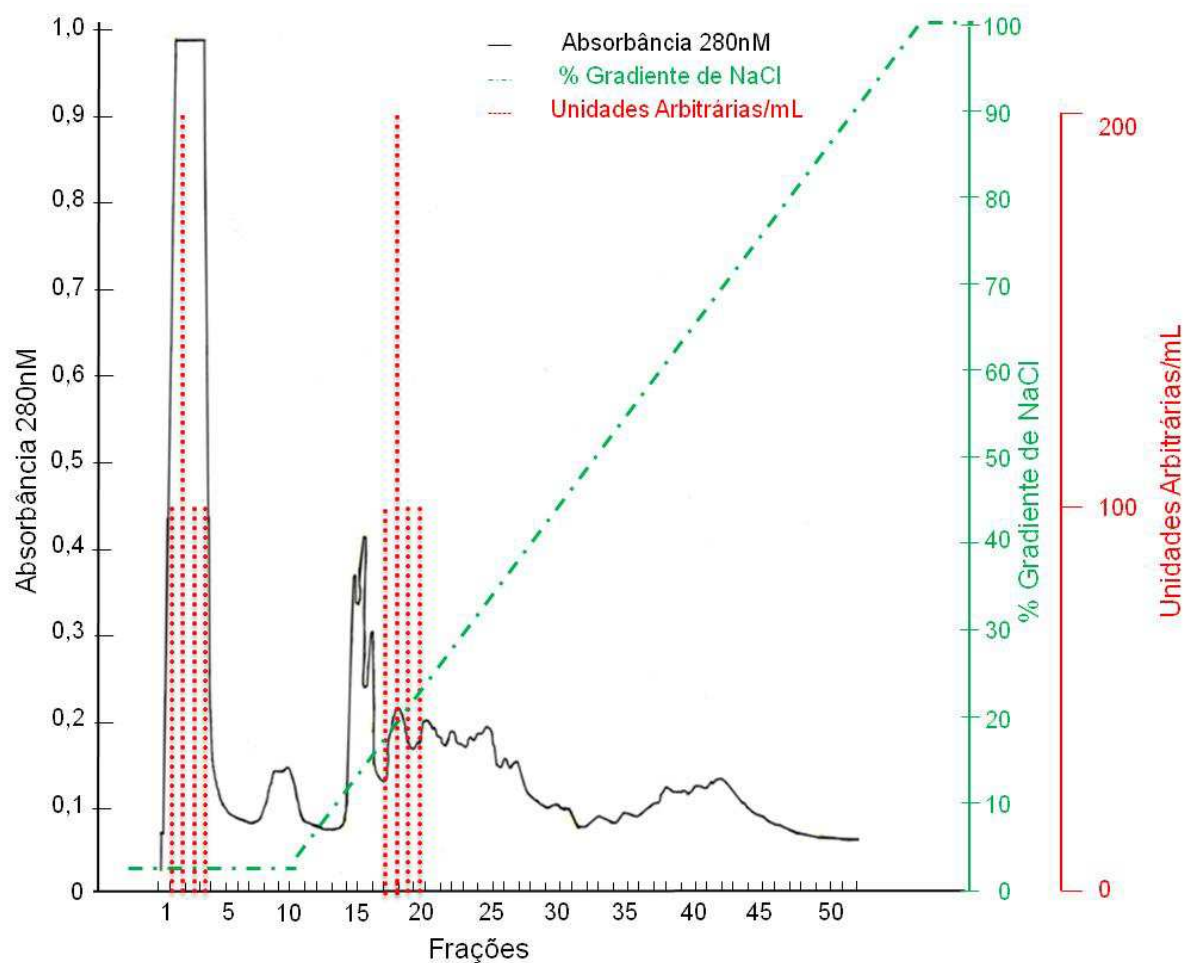
5



10

Figura 9. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações a) 1, 2, 3 e 4 e b) 17, 18, 19 e 20 resultantes da cromatografia de troca iônica do extrato C50. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

15



5

Figura 10. Perfil cromatográfico de troca iônica da fração C50 (fração intracelular precipitada com 50% de $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$) produzida por *P. distasonis* P15, utilizando coluna Mono-QTM, acoplada em sistema de FPLC. Sensibilidade 2,0, leitura a 280 nm. Volume das frações: 2,0 mL. Para a determinação da unidade arbitrária (UA/mL), foi utilizada como reveladora da atividade antagonista a amostra *P. distasonis* ATCC 1945.

10

As frações 1 a 4 oriundas da cromatografia de troca iônica constituíram o *pool* 1 que, aplicado em cromatografia de gelfiltração, gerou 45 frações. Destas, as frações 2 a 5 foram capazes de inibir a amostra reveladora (FIG. 11). O *pool* 2, que incluiu as frações 17 a 20, gerou 32 frações, das quais 12 a 18 expressaram
5 atividade antagonista (FIG. 12). O *pool* 1 apresentou maior rendimento proteico e maior título de atividade quando comparado com o *pool* 2. Os cromatogramas dos *pools* 1 e 2 estão representados na FIG. 13.

O *pool* 3 e 4, constituído pelas frações 2 a 5 e 12 a 18 provenientes da cromatografia de gel filtração, respectivamente, foram aplicados a cromatografia
10 de fase reversa. O *pool* 3 gerou 50 frações, das quais, as frações 27 a 29 (*pool* 5), que foram eluídas com, aproximadamente, 60-65% de acetonitrila, inibiram a amostra reveladora (FIG. 14). O rendimento proteico, após a última etapa de purificação, representou cerca de 0,25% da quantidade proteica inicial do extrato bruto C50. A FIG. 15 mostra o cromatograma obtido na última etapa de
15 purificação para este *pool*. O *pool* 4 gerou 50 frações, sendo que nenhuma apresentou atividade antagonista.

A titulação e a dosagem de proteínas das frações ativas originadas de cada etapa de cromatografia estão representadas na Tabela 4. A origem de cada uma das frações e a constituição dos *pools* estão sumarizados na FIG. 16.

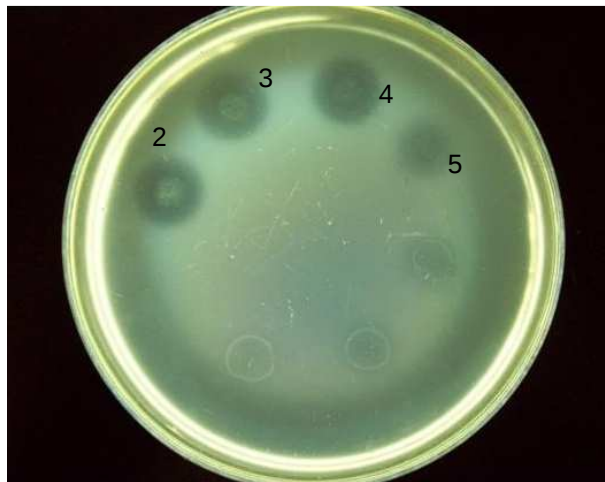
20

5.9 SDS-PAGE

25

O resultado da revelação *in situ* da atividade dos *pools* 1 (frações 1 a 4 resultantes da cromatografia de troca iônica), 3 (frações 2 a 5 oriundas da cromatografia de gel filtração) e 5 (frações 27 a 29 da cromatografia de fase reversa), realizada posteriormente à separação por eletroforese, está apresentado
30 na FIG. 17. Verificou-se a inibição da multiplicação do microrganismo revelador *P. distasonis* ATCC 1295 por todos os *pool*s em região correspondente à mesma massa molecular. Esta região corresponde a uma massa molecular <10 kDa.

5

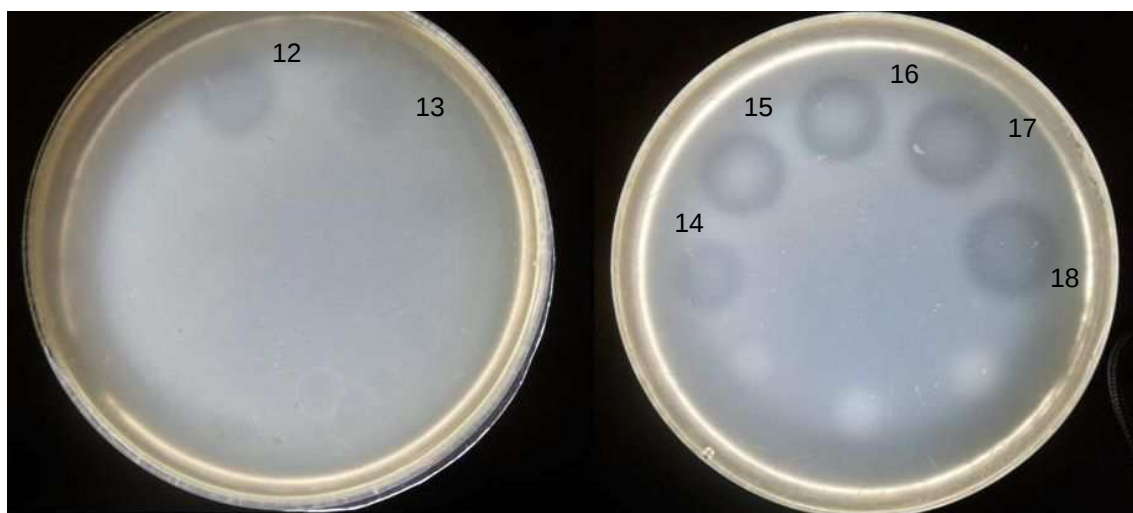


10

Figura 11. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações 2 a 5 resultantes da cromatografia de gel filtração. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

15

5



10

Figura 12. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações 12 a 18 resultantes da cromatografia degel filtração. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

15

5

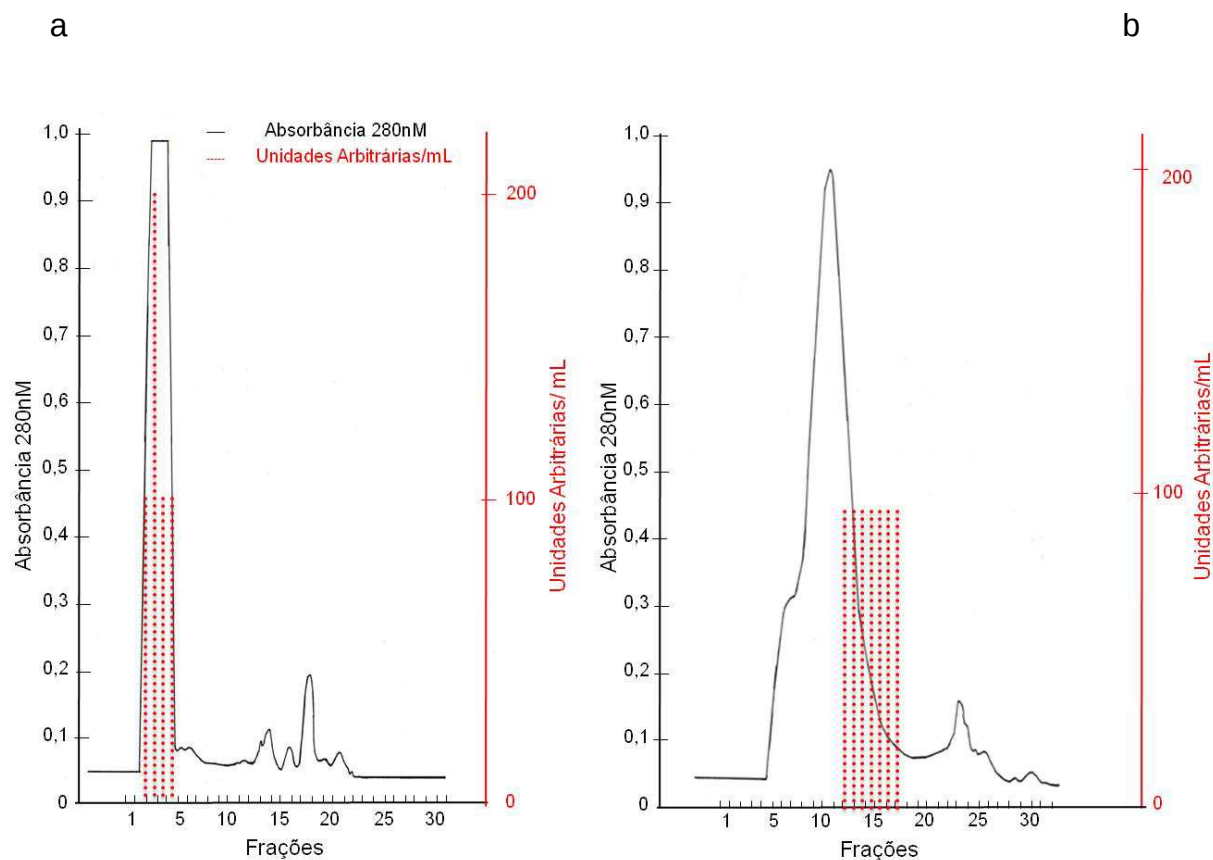
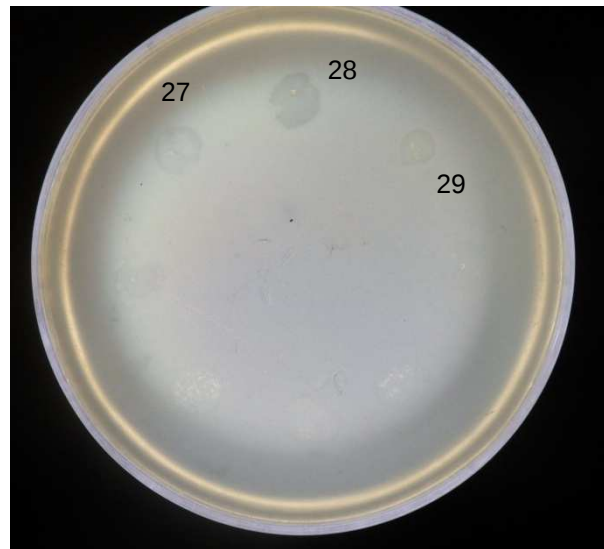


Figura 13. Perfil cromatográfico de gel filtração dos *pools* a) 1 (frações 1 a 4) e b) 2 (frações 17 a 20) oriundos da cromatografia de troca iônica, utilizando coluna de Superose 12 acoplada a sistema de FPLC. Sensibilidade 2,0, leitura 280 nm. Volume das frações 1,5 mL. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

5



10

Figura 14. Zonas de inibição da multiplicação da amostra reveladora pelas frações 27 a 29 resultantes da cromatografia defase reversa. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

15

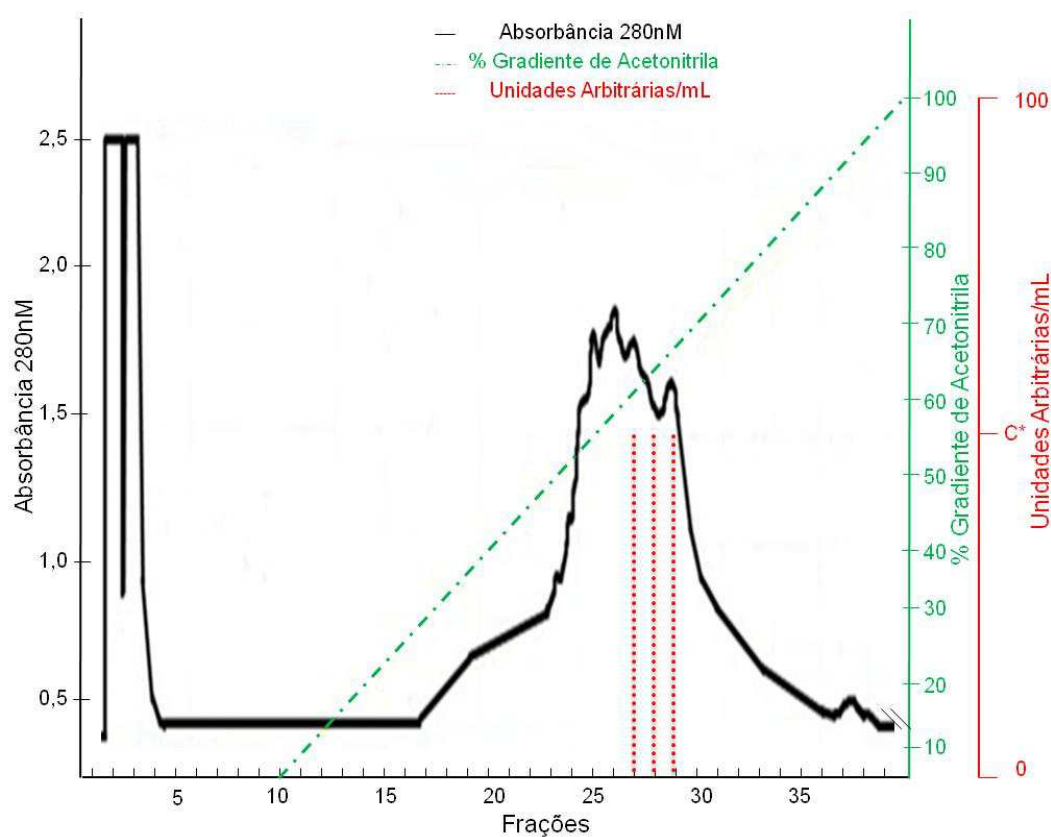


Figura 15. Perfil cromatográfico de fase reversa do *pool* 3 (frações 2 a 5) oriundo da cromatografia de gel filtração, utilizando coluna C18 acoplada a sistema de HPLC. Leitura a 280 nm. Amostra produtora *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

Tabela 4. Titulação da atividade antagonista e dosagem proteica das frações ativas originadas das etapas de cromatografia. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15, amostra reveladora: *P. distasonis* ATCC 1295.

5

Extrato	Fração	Volume (mL)	Atividade (UA/mL)	Concentração proteica (mg/mL)	Proteína total (mg)
Extrato bruto C50	-	22	200	29,06	639,32
Troca iônica	1 a 4	12	200	10,08	120,96
	17 a 20	7	100	19,84	138,88
Gel filtração					
pool 1	2 a 5	5	200	23,42	117,1
frações 1 a 4					
Gel filtração					
pool 2	12 a 18	1,5	100	4,08	6,12
frações 17 a 20					
Fase reversa					
pool 3	27 a 29	0,1	nd	15,7	1,57
frações 2 a 5					

nd, atividade apenas do extrato não diluído

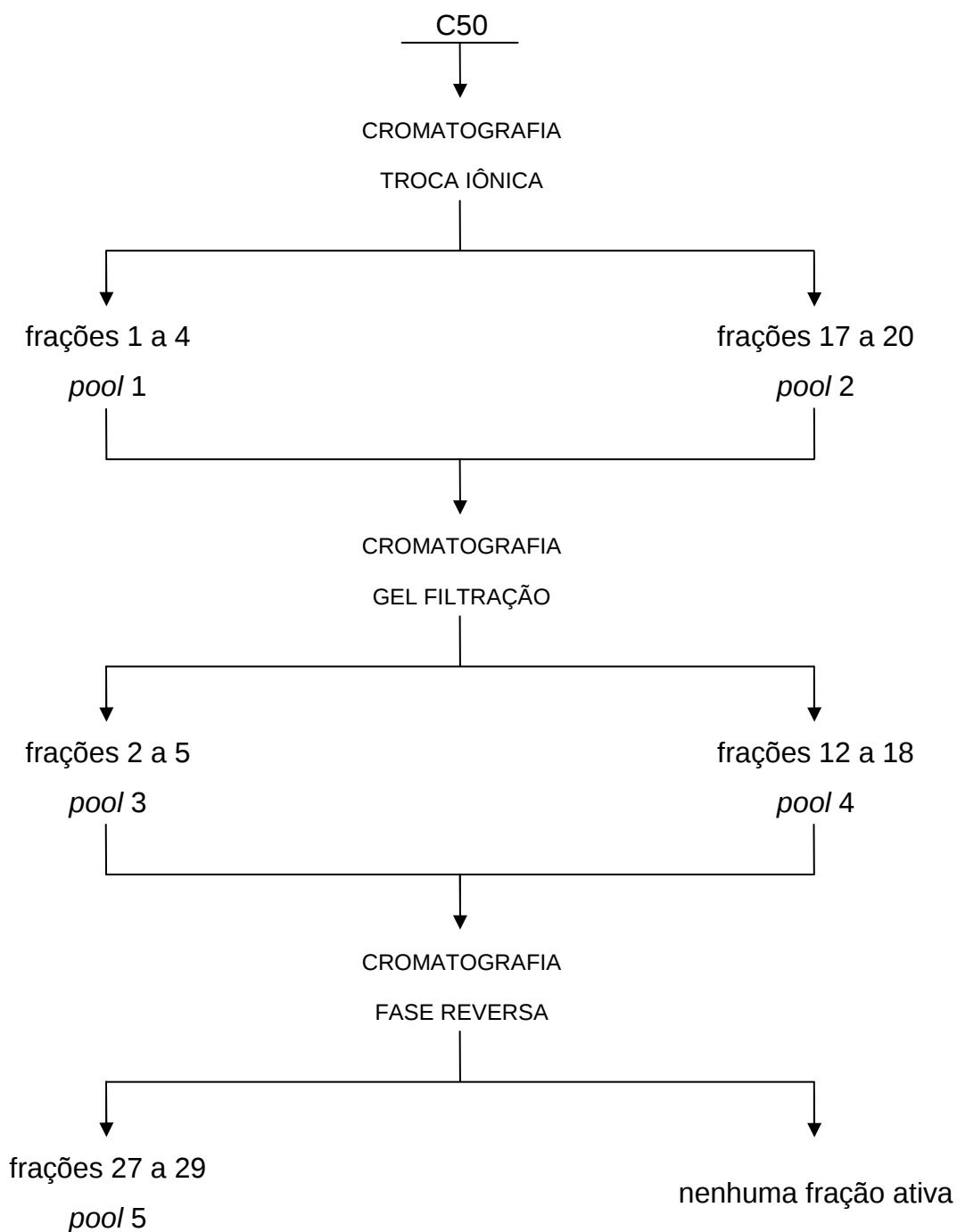
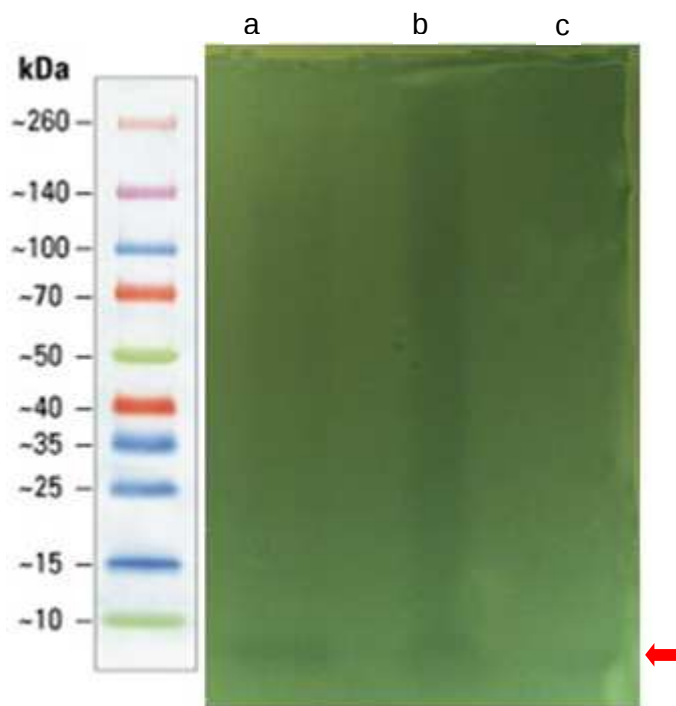


Figura 16. Etapas de purificação da(s) substância(s) antagonista(s) presente(s) no extrato C50 da amostra *Parabacteroides distasonis* P15: origem das frações e constituição dos *pools*.

5



10

Figura 17. Revelação “*in situ*” utilizando SDS-PAGE dos *pools* a) 1 (frações 1 a 4 da cromatografia de troca iônica, b) 3 (frações 2 a 5 da cromatografia de gel filtração) e c) 5 (frações 27 a 29 da cromatografia de fase reversa). Marcador de massa molecular pré-corado 10-260 kDa(Spectra multicolor broad range protein ladder).

15

5.10 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA

5 Os resultados do experimento realizado para verificação da pureza e determinação da massa molecular das substâncias ativas presentes nas frações 27, 28 e 29 obtidas após fracionamento por cromatografia de fase reversa estão sumarizados na Tabela 5 e nas FIG. 18 a 20. Nas três frações, os íons de, aproximadamente, 7000,00 Da geraram sinal mais intenso.

10

Tabela 5. Íons detectados nas frações 27 a 29 oriundas da cromatografia de fase reversa por meio de espectrometria de massas. Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15.

15

Fração	Íons (massa molecular - Da)	
27	7401,329	9013,329
28	7404,951	9065,894
29	7404,433	

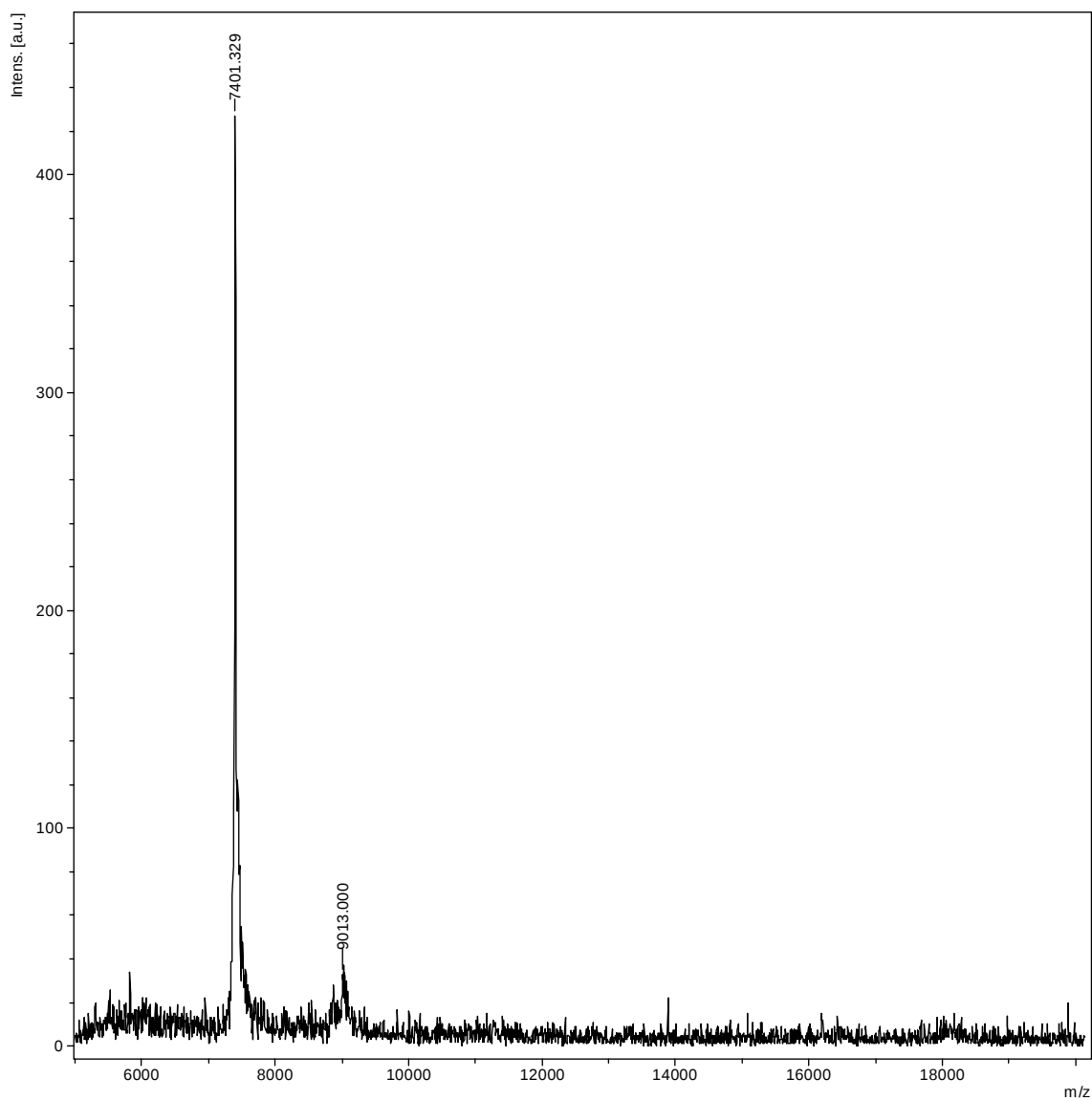


Figura 18. Espectro de massa proveniente da fração 27 oriunda da cromatografia de fase reversa. Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15.

5

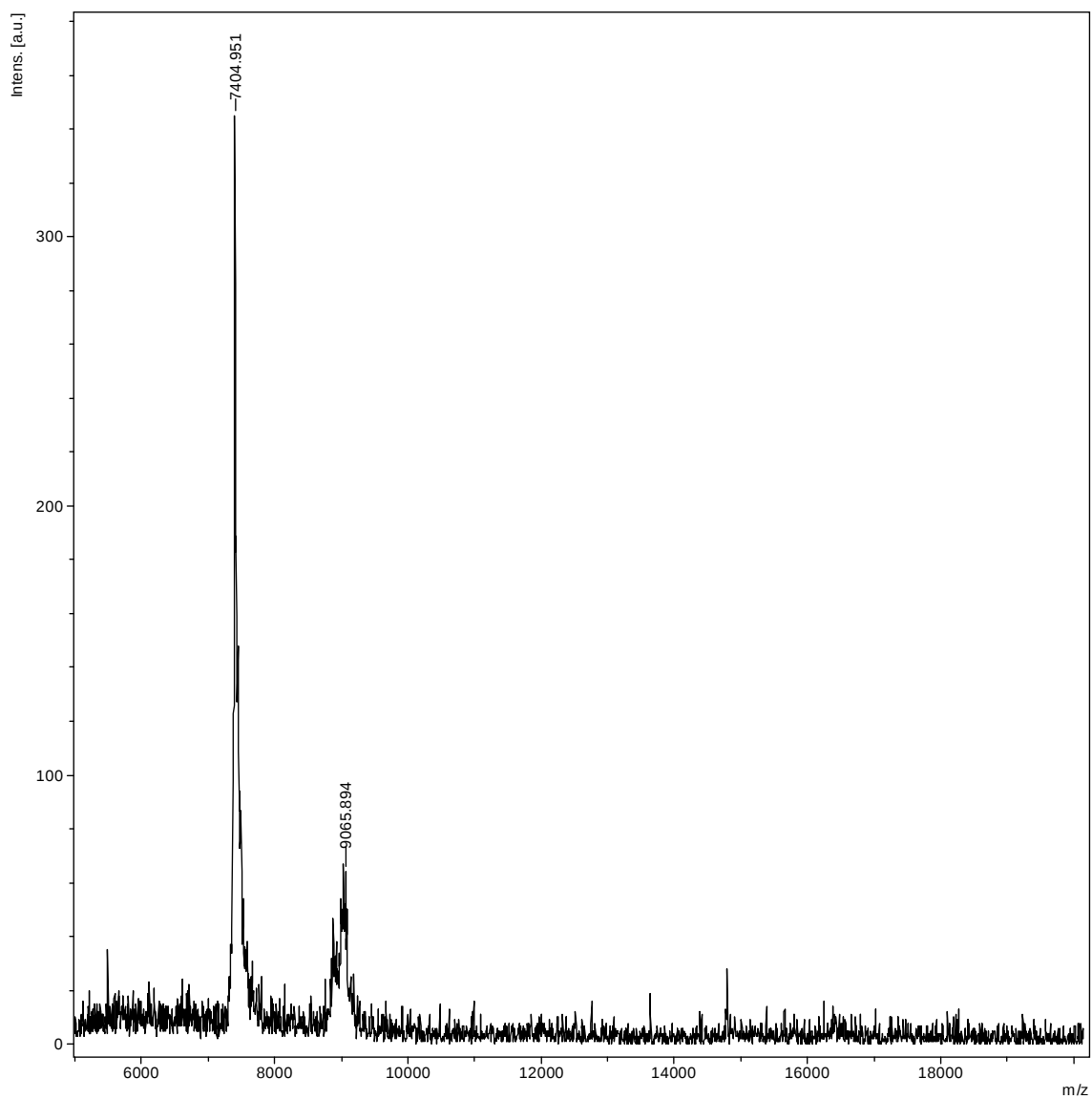


Figura 19. Espectro de massa proveniente da fração 28oriunda da cromatografia de fase reversa. Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15.

5

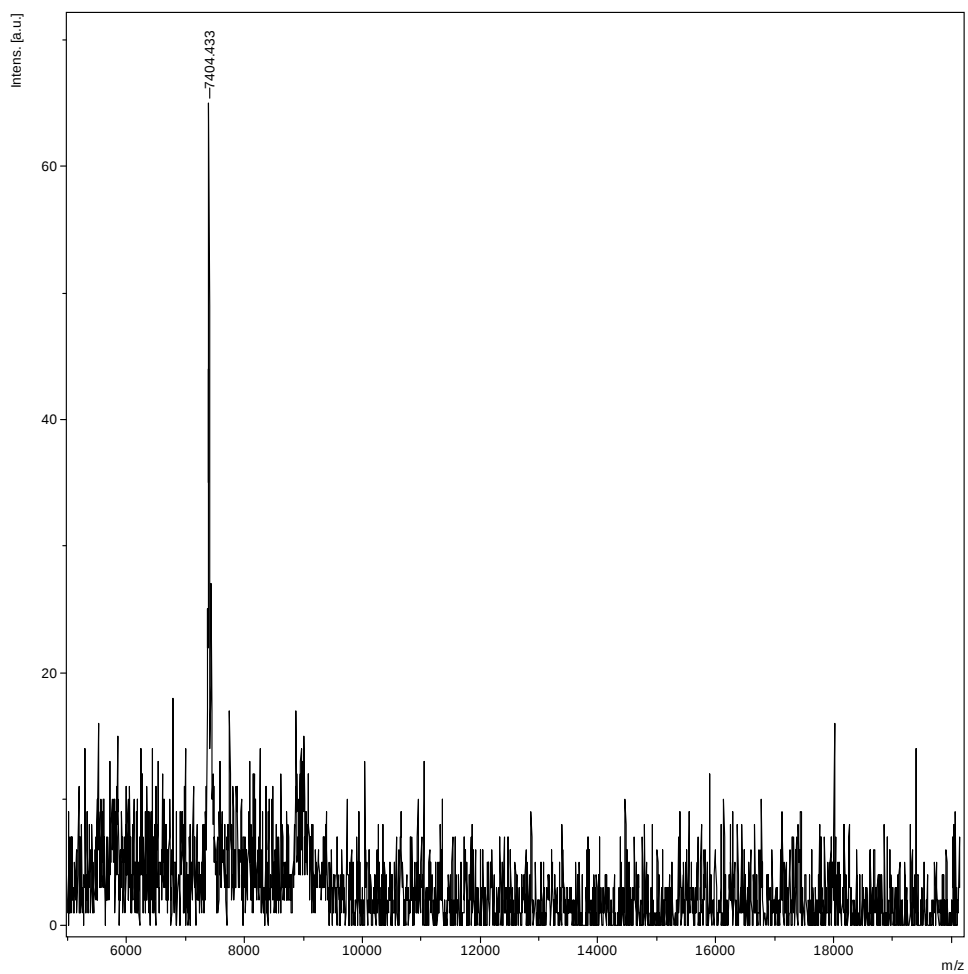


Figura 20. Espectro de massa proveniente da fração 29 oriunda da cromatografia de fase reversa. Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z). Amostra produtora: *Parabacteroides distasonis* P15.

5

6 DISCUSSÃO

O estudo de bacteriocinas, em especial, daquelas produzidas por bactérias Gram positivas, tem despertado interesse crescente nos últimos anos, principalmente devido ao seu potencial de aplicação em vários campos, como, por exemplo, para a preservação de alimentos. Entre elas, destacam-se as bacteriocinas sintetizadas por BAL, as mais estudadas e que apresentam maior potencial para a comercialização (COTTER *et al.*, 2005).

Também as bacteriocinas sintetizadas por amostras Gram negativas têm atraído a atenção dos pesquisadores. Isto não se deve, exclusivamente, à possibilidade de aplicação prática. O estudo destas substâncias pode fornecer informações importantes para a compreensão das relações interbacterianas, especialmente em ecossistemas complexos e dinâmicos, e da virulência dos organismos produtores (RILEY & WERTZ, 2002).

Neste contexto, bactérias Gram negativas, membros da microbiota indígena de seres humanos e outros animais e agentes de doenças infecciosas que acometem, principalmente, o homem, têm sido alvo de investigações conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa (FARIAS *et al.*, 1992, FARIAS *et al.*, 1994; APOLÔNIO *et al.*, 2007; APOLÔNIO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2008; RIBEIRO-RIBAS *et al.*, 2008, SOUSA *et al.*, 2010), incluindo a descrição de novas substâncias antagonistas. Deve-se destacar, entretanto, que bacteriocinas produzidas por bactérias anaeróbias obrigatórias, como *Bacteroides* e *Parabacteroides*, são, ainda, pouco estudadas.

BOOTH *et al.* (1977) e FARIAS *et al.* (1992) estudaram a produção de substâncias antagonistas por várias espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides* e foram os primeiros a observar a expressão deste fenômeno por amostras de *P. distasonis* (na época *Bacteroides distasonis*) isoladas da cavidade oral e intestino de seres humanos. Neste trabalho, realizamos um estudo aprofundado e específico da expressão de heteroantagonismo, isoantagonismo e autoantagonismo por amostras de *P. distasonis* isoladas de espécimes fecais de frangos de corte.

As amostras testadas exibiram alta frequência de isoantagonismo (50%), também demonstrada por Fariaset *al.* (1992), que observou o fenômeno em 52% das amostras de *Bacteroidese Parabacteroides* isoladas de fezes de primatas não humanos do gênero *Callithrix*. De fato, tem sido demonstrado que a maioria das bactérias produz bacteriocinas e que a frequência de produção pode variar em função do hospedeiro colonizado pela bactéria (GORDON & O'BRIEN, 2006), bem como de sua dieta (BARNES *et al.*, 2007) e idade (GORDON *et al.*, 1998), e do tipo de bacteriocina produzida (GORDON & O'BRIEN, 2006). Em ambientes microbianos complexos e densamente colonizados, como o intestino de animais, frequências elevadas de bactérias produtoras de bacteriocinas podem ser observadas. Como exemplo, amostras de *E. coli* que expressam colicinas podem alcançar percentuais de 10 a 80% das amostras da bactéria no trato intestinal de seres humanos e outros animais (GORDON & O'BRIEN, 2006).

Em relação à frequência de suscetibilidade, 97,4% das amostras utilizadas como reveladoras, dentre elas as amostras de *P. distasonis* também empregadas como amostras teste e as amostras de *Bacteroides* foram susceptíveis à atividade antagonista expressa por pelo menos uma amostra. Resultado semelhante foi relatado por Papastathopoulouet *al.* (1997), que observou que 94% das amostras de *B. fragilis* eram suscetíveis a, pelo menos, uma bacteriocina. Adicionalmente, as amostras que produziram bacteriocinas também demonstraram suscetibilidade, o que pode sugerir a produção de mais um tipo de bacteriocina pela espécie nas condições do estudo.

Investigações recentes demonstram que *Parabacteroides*, juntamente com *Bacteroides*, são gêneros predominantes no trato intestinal de animais, como mamíferos e aves (OLSEN *et al.*, 2008). A alta densidade populacional observada, por exemplo, no trato intestinal de aves, pode influenciar de maneira relevante as interações entre organismos, da mesma espécie ou de espécies diferentes, favorecendo relações microbianas tanto cooperativas como antagonistas (GILLOR *et al.*, 2009). A síntese de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, pode conferir vantagem competitiva aos organismos produtores sobre as amostras suscetíveis presentes no mesmo ambiente, permitindo o estabelecimento e a prevalência elevada dos mesmos. Este

fenômeno influencia as populações microbianas, podendo, assim, estar relacionado com o equilíbrio da microbiota indígena e com a saúde do hospedeiro (O'SHEA *et al.*, 2011).

Bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas apresentam espectro de ação mais restrito quando comparadas com aquelas sintetizadas por bactérias Gram positivas, inibindo, geralmente, amostras da mesma espécie ou de espécies filogeneticamente relacionadas (NISHIE *et al.*, 2012). O presente estudo demonstrou que amostras de *P. distasonis* foram capazes de inibir bactérias da mesma espécie e de espécies filogeneticamente relacionadas, como *Bacteroides*, *Prevotella* e *Porphyromonas*. Adicionalmente, também foi observada atividade contra bactérias mais afastadas do ponto de vista taxonômico, como *Fusobacterium necrophorum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Beeren *et al.* (1965), Booth *et al.* (1977), Mossie *et al.* (1979) e Hayes *et al.* (1983) reportaram a detecção de bacteriocinas produzidas por amostras de *B. fragilis* com estreito espectro de ação. Em contrapartida, semelhantemente ao observado neste estudo, Farias *et al.* (1992) relatou atividade antagonista expressa por *Bacteroides* e *Parabacteroides* contra amostras não relacionadas, inclusive Gram positivas, como *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus pyogenes*. Assim, nossos resultados corroboram dados de Farias *et al.* (1992), indicando que bacteriocinas podem contribuir para a virulência de amostras de *P. distasonis* presentes no trato intestinal de frangos na competição intra e interespecífica.

Duas amostras exibiram atividade contra outras do mesmo clone, fenômeno denominado autoantagonismo. Embora este fenômeno seja mais frequentemente descrito para bactérias Gram positivas (JACK *et al.*, 1995), sua expressão também já foi observada para alguns microrganismos Gram negativos (FARIAS *et al.*, 1994; MIRANDA *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 2002, APOLONIO *et al.*, 2007). O autoantagonismo pode ser explicado pelo desbalanço na concentração de proteínas que conferem imunidade à célula produtora (LEVISOHN *et al.*, 1967). Por exemplo, os genes que codificam a síntese de colicina e sua liberação compartilham o mesmo promotor, enquanto que o gene que codifica a proteína de imunidade é induzido por um promotor constitutivo que mantém um nível basal da mesma. Se houver algum problema na transcrição basal do gene, a célula torna-

se suscetível à bacteriocina que ela apresenta habilidade de produzir(CASCALES *et al.*, 2007).

Entre as amostras de *P. distasonis* que expressaram atividade antagonista, P15 foi selecionada para os passos subsequentes do estudo, que incluíram extração, caracterização e purificação da substância antagonista produzida. A escolha baseou-se no fato de que P15 expressou atividade antagonista contra um número maior de bactérias da mesma espécie, bem como espectro de ação mais amplo e halos de inibição da multiplicação das amostras reveladoras mais límpidos e visíveis.

P15 demonstrou, ainda, atividade antagonista contra amostras clínicas de *Bacteroides* e *Parabacteroides*. Praticamente todas as amostras das bactérias isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal demonstraram suscetibilidade a P15, o que reforça o potencial de aplicação prática da substância. No que se refere a *Campylobactere Salmonella*, importantes patógenos que podem colonizar o trato intestinal de aves,não se observou antagonismo.

Entre as bactérias utilizadas como reveladoras, a amostra de referência *P. distasonis* ATCC 1295 destacou-se pela maior suscetibilidade e pelos halos de inibição mais nítidos. Por esta razão, foi empregada como reveladora nos passos subsequentes do estudo. Amostras da mesma espécie (*B. fragilis*)também já foram empregadas como produtora e reveladora em investigação conduzida por Avelar *et al.* (1999).

Existe uma variedade de substâncias antagonistas produzidas por bactérias, dentre elas substâncias antimicrobianas não específicas, como ácidos, e peróxido de hidrogênio, e substâncias antimicrobianas específicas, como bacteriocinas. Bacteriófagos também podem atuar como agentes antibacterianos (GILLOR *et al.*, 2008a). A pesquisa destas substâncias foi realizada para possibilitar a análise adequada dos resultados. Os resultados demonstraram que a inibição observada não se devia à produção de ácidos graxos, uma vez que a adição de amido, que formaria complexos com os mesmos, inibindo a expressão de sua atividade, não alterou a expressão da atividade. O peróxido de hidrogênio também não foi responsável pela inibição, pois a adição de catalase, que decompõe a substância, não interferiu no resultado do experimento. A técnica

preconizada pela literatura (BOOTH *et al.*, 1977; TURNER & JORDAN, 1981; FARIAS *et al.*, 1992; APOLÔNIO *et al.*, 2007) para exclusão da ação de bacteriófagos na atividade antagonista, permitiu demonstrar a ausência de entidades líticas virais na zona de inibição, indicando que a inibição não foi devida
5 a presença de fagos. Além destes fatores, a interferência de clorofórmio residual, possivelmente presente em decorrência do uso da substância na pesquisa de expressão de atividade antagonista, que também poderia ser responsável pela inibição da amostra reveladora, foi excluída. Em conjunto, os dados sugerem a produção de uma substância antibacteriana de natureza proteica.

10 Motivados pela ausência de relatos na literatura referentes à purificação de substâncias tipo bacteriocina sintetizadas por *P. distasonis*, realizou-se extração proteica pelo método de precipitação por meio do emprego de concentrações crescentes de sulfato de amônio (30, 50 e 80%). Foram obtidas três frações ativas, duas intracelulares, C30 e C50, e uma extracelular, S50. Embora S50
15 tenha apresentado o maior título de atividade antagonista, a fração não foi selecionada para as demais etapas da investigação pelo fato de ser pouco estável. De fato, a atividade de S50 foi perdida após uma semana de armazenamento em freezer -80 °C. É possível que a presença de enzimas proteolíticas nas frações extracelulares, capazes de clivar a substância
20 antagonista, explique esta instabilidade.

Em decorrência do exposto, optou-se por utilizar a fração C50 nas etapas posteriores da investigação. Extratos intracelulares já foram utilizados com sucesso por outros autores (MIRANDA *et al.*, 1993; FARIAS *et al.*, 1994; APOLÔNIO *et al.*, 2007; RIBEIRO-RIBAS *et al.*, 2009).

25 Para a viabilização das diversas etapas envolvidas na caracterização e purificação de bacteriocinas, é fundamental o alto rendimento na obtenção da substância. Assim, a otimização das condições de cultivo da amostra produtora, que podem interferir no rendimento da produção de bacteriocinas, é um passo essencial do processo (DE VUYST & LEROY, 2007). A amostra de *P. distasonis*
30 P15 foi cultivada sob diferentes condições de incubação, sendo submetida a estresse oxidativo pela exposição a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio,

co-cultivada com a amostra suscetível e incubada por diferentes períodos de incubação.

No que se refere ao tempo de incubação, a ausência de expressão de antagonismo pela amostra cultivada por 24 h e a atividade observada para a cultura incubada por 48 h sugere que a produção da substância antagonista ocorre, principalmente, em uma fase mais tardia da curva de crescimento de *P. distasonis* P15.

Em relação ao efeito do estresse oxidativo provocado por O₂, observou-se o aumento do título de atividade antagonista, o que corrobora o conceito de que a produção de bacteriocinas por bactérias Gram negativas é estimulada por condições de estresse. Os genes que codificam a síntese de colicinas, por exemplo, são regulados pelo sistema SOS regulon, que desempenha um papel fundamental na resposta a estresse em procariotos. Assim, quando a amostra é submetida a um estresse, ocorre indução, que leva ao aumento dos níveis de expressão da bacteriocina (GILLOR *et al.*, 2008b).

O extrato C50 foi submetido a diferentes tratamentos para sua caracterização. No que se refere à avaliação de termotolerância, observou-se perda da atividade antibacteriana pela exposição à temperatura de 70°C por 20 min e 50 °C por 4 h. Resultados similares foram encontrados por Avelar *et al.* (1999), que caracterizaram uma bacteriocina produzida por *B. fragilis*, que perdeu completamente a atividade na temperatura de 100 °C e manteve-se ativa por 20 min a 60 °C. Fariaset *al.* (1994) também caracterizaram uma bacteriocina de *B. fragilis* que perdeu sua atividade quando o extrato foi submetido a tratamento com temperaturas acima de 60 °C.

A atividade antagonista de C50 foi preservada em temperaturas mais baixas, como -20°C e -86°C, por até 12 meses, último período em que o teste foi realizado. A 37°C, sua atividade foi mantida por 30 dias, período bastante superior ao observado para bacteriocinas de *B. fragilis* (MOSSIE *et al.*, 1979; HAYES *et al.*, 1983). Esta estabilidade pode ser útil para a amostra produtora em termos biológicos, podendo conferir persistência da substância no ambiente, inclusive no intestino de aves, que apresenta temperatura próxima a 37 °C.

Os ensaios realizados para detecção de interferência do pH na atividade antagonista de C50 apontaram uma faixa extensa na qual ela foi preservada, abrangendo valores ligeiramente ácidos, neutro e básicos. Este resultado corrobora estudos realizados anteriormente envolvendo bacteriocinas produzidas por amostras de *Bacteroides* que também apresentaram estabilidade a uma ampla gama de pH e foram inativadas quando expostas a valores de pH superiores a 10 (MOSSIE *et al.*, 1979; HAYES *et al.*, 1983; FARIAS *et al.*, 1992; MIRANDA *et al.*, 1993, AVELAR *et al.*, 1999). Entretanto, no que se refere à manutenção da atividade da substância antagonista detectada nesta investigação após um período razoável de tempo (seis dias) em pH ácido, nenhum resultado semelhante foi relatado para bacteriocinas sintetizadas por *Bacteroides*, que permanecem ativas por períodos mais curtos. A inativação da substância antibacteriana após 30 dias de exposição a valores de pH de 5 a 10 pode ser explicada pelos resultados relativos à termoestabilidade. Após este período, a substância é inativada pela temperatura. Assim, é possível que a substância antagonista seja, na verdade, ainda mais estável aos diferentes valores de pH.

A atividade antimicrobiana do extrato C50 foi diminuída pela ação de pepsina e proteinaseK e inativada por papaína, tripsina e α -quimotripsina. A sensibilidade da substância antimicrobiana a proteases sugere sua natureza proteica, portanto, sua possível identificação como bacteriocina. Segundo MINAMIKAWA *et al.* (2005), as bacteriocinas são inativadas por, pelo menos, uma enzima proteolítica.

Os testes realizados com solventes orgânicos mostraram que nenhum deles foi capaz de influenciar negativamente a atividade antibacteriana do extrato proteico, indicando que não há grupamentos lipídicos associados essenciais para a expressão de atividade antibacteriana.

Os agentes antibacterianos podem agir de forma bactericida ou bacteriostática. Agentes bacteriostáticos inibem a multiplicação de células bacterianas, mas não as matam, enquanto os bactericidas o fazem. Em geral, agentes que rompem a parede ou a membrana celular ou interferem em enzimas bacterianas essenciais, são bactericidas, ao passo que agentes que inibem a função ribossomal e a síntese de proteínas costumam ser bacteriostáticos. Muitos

estudos avaliam o modo de ação de bacteriocinas pela pesquisa da CIM e da CBM, pois, a comparação entre estes valores permite determinar se a substância antimicrobiana possui atividade bactericida ou bacteriostática (FRENCH, 2006).

A CBM do extrato intracelular C50 contra *P. distasonis* ATCC 1295 foi 25 vezes superior ao valor da CIM. De acordo com a literatura, um agente é reconhecido como bactericida, habitualmente, se o valor da CBM não é superior a quatro vezes o valor da CIM (FRENCH, 2006). Portanto, estes resultados apontam para uma atividade bacteriostática de C50 contra a amostra reveladora utilizada. Este dado é semelhante ao descrito por MOSSIE *et al.* (1979), que descrevem uma bacteriocina produzida por *B. fragilis* com atividade de RNase, inibindo a síntese proteica, portanto, com modo de ação bacteriostático.

É importante ressaltar que todos os resultados obtidos em nossos estudos e discutidos até o momento, referem-se ao extrato intracelular bruto de *P. distasonis* P15 precipitado à concentração de 50% de sulfato de amônio. Tal extrato contém diversas substâncias, podendo, portanto, sua atividade antibacteriana ser devida a uma única ou a várias delas. Assim, após purificação da substância antimicrobiana em estudo, deve-se refazer toda a caracterização descrita até aqui. É possível que alguns resultados relativos à estabilidade da substância frente a condições diversas e seu modo de ação sejam divergentes dos dados aqui relatados.

Não existem protocolos específicos e já determinados que possam ser aplicados indiscriminadamente para purificação de bacteriocinas. O procedimento é, geralmente, realizado na forma “tentativa e erro”, até que os passos a serem seguidos para a obtenção do peptídeo puro sejam otimizados. O processo para a obtenção de uma bacteriocina altamente pura é bastante complexo e, geralmente, envolve várias etapas, desde a extração até o uso de diferentes cromatografias para o desenvolvimento de um protocolo que atinja os objetivos finais, seja para permitir a realização de estudos futuros seja para aplicação da bacteriocina na indústria.

Para a purificação da substância antagonista presente no extrato proteico, foram realizadas, neste trabalho, etapas sucessivas de cromatografia. Primeiramente, empregou-se cromatografia de troca iônica em coluna MONO-Q

HR 5/5, que possui trocadores aniônicos e apresenta como grupo carregado -CH₂-N⁺(CH₃). As frações que apresentaram atividade antagonista foram detectadas em dois picos distintos do cromatograma, sugerindo a existência de duas moléculas com características iônicas diferentes. As frações 1 a 4, observadas em um dos picos, foram eluídas antes do início do gradiente realizado com NaCl 1 M, o que indica que a substância ativa presente na fração não foi capaz de interagir com o grupo carregado positivamente da coluna, sugerindo a natureza catiônica ou neutra da mesma. Já as demais frações, 17 a 20, detectadas no segundo pico, ligaram-se à coluna e foram eluídas em, aproximadamente, 20-25% de NaCl, indicando natureza aniônica.

Subsequente à cromatografia de troca iônica, as frações ativas foram submetidas a cromatografia por filtração. Para isto, as mesmas foram combinadas em *pools*, *pool* 1, que incluiu as frações catiônicas ou neutras e *pool* 2, constituídos pelas frações de natureza aniônica. A coluna utilizada foi a Superose 12 HR 10/30, formada por uma matriz de agarose, com faixa de separação ótima variando de 1000Da a 300000Da. As frações ativas do *pool* 1 (2 a 5) localizaram-se em um pico no início do cromatograma, indicando partículas com massas moleculares maiores. Já o *pool* 2 originou frações (12 a 18) com atividade em tempos de retenção intermediários, indicando massa molecular intermediária.

Algumas bacteriocinas podem permanecer como agregados com massa molecular elevada, em torno de 30 a 300 kDa. Estes agregados acabam induzindo a determinação errada da massa molecular durante a cromatografia por filtração. Isto geralmente acontece com bacteriocinas apolares e de baixa massa molecular, que interagem com material extracelular de células lisadas, no processo de extração, como *debris* da parede celular e micelas de ácidos lipoteicoicos, e com outros compostos apolares do meio de cultura (CINTAS *et al.*, 2001).

Na última etapa de purificação, empregou-se a cromatografia líquida de fase reversa (HPLC). As frações ativas 2 a 5 e 12 a 18 foram misturadas para constituição dos *pools* 3 e 4, respectivamente. O material foi aplicado na coluna C18 Shim-pack CLC-ODS, que apresenta, em sua fase estacionária, o grupo de natureza apolar octadecil. Apenas o *pool* 3 gerou frações com atividade

antimicrobiana. O fato do *pool* 4 não ter gerado frações ativas após HPLC pode ser explicado pelo fato das frações constituintes do mesmo terem exibido uma menor atividade e menor concentração proteica já na avaliação realizada após cromatografia de filtração. Assim, quando aplicado na RP-HPLC, possivelmente, a substância antagonista estava presente em baixa concentração, insuficiente para ser detectada pelo teste realizado. As frações ativas originadas do *pool* 3 (27 a 29) foram eluídas em, aproximadamente, 60-65% de acetonitrila, o que sugere que o componente das frações ativas possui caráter hidrofóbico.

Possivelmente, a amostra *P. distasonis* P15 produz mais de um tipo de substância antagonista, pois dois perfis diferentes foram detectados na cromatografia de troca iônica. Foi realizada a tentativa do estudo das diferentes substâncias, mas, como mencionado acima, a substância com caráter aniônico, não foi detectada na HPLC, possivelmente, em decorrência do menor rendimento do processo de purificação da mesma. Assim, apenas a substância com caráter catiônico ou neutro e hidrofóbico foi detectada até a última etapa de purificação.

O experimento de revelação *in situ* realizado após SDS-PAGE demonstrou presença de uma zona de inibição da amostra reveladora em região correspondente a uma massa molecular comum para as frações ativas obtidas após todas as etapas de purificação por cromatografia. A banda ativa tinha massa molecular inferior a 10 kDa.

As frações 27 e 28 originadas da cromatografia de fase reversa, quando submetidas ao analisador de massas (MALDI-TOF), usando a matriz ácido sinapínico, apresentaram dois íons, de aproximadamente 7000 Da (maior intensidade) e 9000 Da (menor intensidade). Já a fração 29 apresentou apenas um íon de cerca de 7000 Da. A massa molecular da molécula de maior intensidade é compatível com aquela da banda ativa revelada após SDS-PAGE, sugerindo a detecção de uma bacteriocina de cerca de 7000 Da. Relatos referentes a *Bacteroides* apontam a síntese de substâncias antagonistas com massas moleculares muito diversas, como 5 kDa (HAYES *et al.*, 1983), 16 kDa (MOSSIE *et al.*, 1979) e 300 kDa (BOOTH *et al.*, 1977) e, mesmo, bacteriocinas constituídas por duas proteínas com massas diferentes, de 150 e 36 kDa (FARIAS *et al.*, 1994).

Após cada etapa de purificação, a concentração de proteína e a atividade antagonista foram quantificadas. No final do processo, obteve-se uma recuperação de 0,245% da substância ativa. Isto demonstra o rendimento baixo do protocolo empregado, apenas o suficiente para permitir a análise por espectrometria de massas. A quantidade de material obtido não permitiu o sequenciamento da porção N-terminal da possível bacteriocina purificada.

Sendo assim, os dados demonstram a necessidade de prosseguimento dos ensaios. É fundamental a otimização do protocolo de purificação, para permitir maior rendimento na recuperação da substância ativa, para que a mesma possa ser mais bem caracterizada e, inclusive, sequenciada. Considerando-se a provável influência da bacteriocina nas relações ecológicas de *P. distasonis* no trato intestinal de aves e seu potencial de aplicação na inibição de amostras associadas à etiopatogenia de infecções intra-abdominais, estudos futuros são desejáveis.

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- 5 • *P. distasonis* produz substância antibacteriana com atividade autoantagonista, isoantagonista e heteroantagonista e espectro de ação relativamente amplo, incluindo bactérias Gram negativas, inclusive filogeneticamente não relacionadas.
- 10 • A exclusão de fatores que poderiam interferir na interpretação dos resultados dos testes fenotípicos reforça a hipótese de que o antagonismo expresso por *P. distasonis* pode ser atribuído à síntese de substância(s) de natureza proteica, possivelmente bacteriocina(s).
- 15 • As diferenças observadas no perfil de suscetibilidade das amostras reveladoras sugerem que as amostras de *P. distasonis* expressam mais de um tipo de substância antagonista.
- A amostra de *P. distasonis* P15 selecionada para o estudo exibiu atividade antagonista contra amostras clínicas de *Bacteroides* e *P. distasonis*, sugerindo um potencial de aplicação prática da substância.
- 20 • O extrato intracelular de *P. distasonis* P15 precipitado com sulfato de amônio à saturação de 50% (C50) contém substância(s) antagonista(s) ativa(s) contra *P. distasonis* ATCC 1295, cuja produção é estimulada por estresse oxidativo.
- 25 • C50 apresentou baixa estabilidade quando submetido a tratamentos térmicos, manteve-se ativo frente a diferentes valores de pH e diversos solventes orgânicos e sua natureza proteica foi confirmada pela inativação por proteases.
- Os valores de CIM e CBM de C50 demonstram que o extrato exerce ação bacteriostática contra *P. distasonis* ATCC 1295.

- Os resultados obtidos durante a etapa de purificação de C50 sugerem a presença de mais de uma substância antagonista. A substância estudada apresenta caráter catiônico ou neutro e hidrofóbico.
- Os dados obtidos por meio de SDS-PAGE e espectrometria de massas indicam que a substância antagonista purificada apresenta massa molecular de cerca de 7 kDa, sendo, portanto, um peptídeo.
- Para que seja possível a aplicação prática da substância antagonista detectada é fundamental a otimização do protocolo de purificação, visto que o método empregado apresentou rendimento baixo.

10

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-TAWFIQ, J. F. *Bacteroides (Parabacteroides) distasonis* splenic abscess in a
5 sickle cell patient. *Intern.Med.*, v. 18, 98-100, 2007.
- APAJALAHTI, J. H.; KETTUNEN, A.; BEDFORD, M. R.; HOLBEN, W. E. Percent
G + C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal
microbial community of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 5656-
5667, 2001.
- 10 APAJALAHTI, J. H.; KETTUNEN, A.; GRAHAN, H. Characteristics of the
gastrointestinal microbial communities with special reference to the chicken. *W.
Poult Sci.*,v. 60, p. 223-232, 2004.
- APOLÔNIO, A. C. M.; CARVALHO, M. A. R.; RIBAS, R. N. R.; SOUSA-GAIA, K.
V.; SANTOS, K.V.; LANA, M. A.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M. Production of
15 antagonistic substance by *Eikenella corrodens* isolated from the oral cavity of
human beings with and without periodontal disease.*J. Appl. Microbiol.*,v. 103, p.
245-251, 2007.
- APOLÔNIO, A. C. M.; CARVALHO, M. A. R.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO,
M. M.; PINTO, S. Q.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, K. V.; FARIAS, L. M. Purification
20 and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. *J.
Appl. Microbiol.*,v.104, p. 508-14, 2008.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.
G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. *Short Protocols in Molecular Biology*, v. 4, p.1931,
1997.
- 25 AVELAR, K. E. S.; PINTO, L. J. F.; LOBO, L. A.; BASTOS, M. C. F.;
DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, M. C. Production of bacteriocin by
Bacteroides fragilis and partial characterization. *Lett. Appl. Microbiol.*,v. 29, p. 264-
268, 1999.
- AVILA-CAMPOS, M. J.; RAYMUNDO, N. L. S.; FARIAS, L. M.; SILVA, S. L.;
30 CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; PEREIRA, L. H.; CISALPINO, E.

- O. Isolation and identification of strains of *Bacteroides fragilis* group from the digestive tract of *Callithrix penicillata* marmosets. *Lab. Anim.*, v. 24, p. 68-70, 1990.
- AWADEL-KARIEM, F. M.; PATEL, P.; KAPOOR, J.; JONS, B. First report of *Parabacteroides goldsteinii* bacteraemia in a patient with complicated intra-abdominal infection. *Anaerobe*, v. 16, p. 223-225, 2010.
- BAJZER, M.; SEELEY, R. J. Obesity and gut flora. *Nature*, v. 444, p. 1009-1010, 2006.
- BAKIR, M. A.; KITAHARA, M.; SAKAMOTO, M.; MATSUMOTO, M.; BENNO, *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 56, p.931-935, 2006.
- BAQUERO, F.; MORENO, F. The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 23, p. 111-124, 1984.
- BARBOSA, F. H. F.; MARTINS, F. S.; BARBOSA, L. P. J.L.; NICOLI, J. R. Microbiota indígena do trato gastrintestinal. *Revis. Bio. Cienc. Terra.*, v. 10, p. 78-83, 2010.
- BARNES, B.; SIDHU, H.; GORDON, D. M. Host gastro-intestinal dynamics and the frequency of colicin production by *Escherichia coli*. *Microbiol.*, v. 153, p. 2823-2827, 2007.
- BAUGHN, A. D.; MALAMY, M. H. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature*, v. 427, p. 441-444, 2004.
- BEERENS, H.; BARON, G. Mise en evidenced bacteriocines elaborees par les bacteries anaerobies a gram negatif appartenant au genre *Eggerthella*. *Annual Institut Pasteur*, v. 108, p. 255-266, 1965.
- BENEDETTI, H.; LOUUBER, R.; LAZDUNSKI, C.; LETELLIER, L. Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.*, v. 11, p. 441-447, 1991.

- BENITEZ, L.; CORREA, A. P.; DAROIT, D. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the presence of *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.*,v. 62, p. 1017-1022, 2011.
- 5 BERG, J. O.; LINDQVIST, L.; ANDEERSON, G.; NORD, C.E. Neuraminidase in *Bacteroides flagilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*,v. 46, p. 75-80, 1983.
- BETRIU, C.; CULEBRAS, E.; GOMES, M., RODRIGUEZ, I.; PICAZO, J. J. The activity *in vitro* of tigeciclin against of species *Bacteroides*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 56, p. 349-351, 2005.
- 10 BJERRUM, L.; ENGBERG, R. M.; LESER, T. D.; JENSEN, B. B.; FINSTER, K.; PEDERSEN, K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult Sci.*,v. 85, p. 1151-1164, 2006.
- BOENTE, R. F.; FERREIRA, L. Q.; FALCAO, L. S.; MIRANDA, K. R.; GUIMARÃES, P. S. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in 15 *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe*, v. 16, p. 190-194, 2010.
- BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINNS, T. D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of theses strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob. Agen.Chemother.*, v. 11, p. 718-724, 1977.
- 20 BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J.; SCOOT, M. G.; HANCOCK, R. E. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob. Agen.Chemother.*, v. 49, p. 1727-1732, 2005.
- BRADFORD, M.M. *Anal. Biochem.*,v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*,1931.
- 25 BROOK, I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe*, v. 16, p. 183-189, 2010
- BURIANEK, L. L.; YOUSEF, A. E. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Lett. Appl. Microbiol.*,v. 31, p. 193-197, 2000.

- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, v. 10, p. 729-734, 2007.
- CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LOUBES, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 71, p. 158-229, 2007.
- CHAVAN, M. A.; RILEY, M. A. Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria, In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Heidelberg, Germany, 2007, p. 5-18.
- CHEIGH, C. I.; PYUN, Y. R. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.*, v. 27, p. 1641-1648, 2005.
- CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 2, p. 82-100, 2003.
- CHERIF, A.; REZGUI, W.; RADDADI, N.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD 110. *Microbiol. Res.*, v. 163, p. 684-92, 2008.
- CINTAS, L. M.; HERRANZ, C.; HERNANDEZ, P. E. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci.*, v. 7, p. 281-305, 2001.
- CLEVELAND, J. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, p. 1-20, 2001.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard - Seventh Edition*, v. 27 (2). CLSI document M11-A7 (ISBN 1-56238-626-3). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2012.
- COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, v. 326, p. 1694-1697, 2009.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. R. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, p. 777-788, 2005.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. R. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. *Nat. Rev. Microbiol.*, publicado online, 2012.

- 5 CRAMER, W. A.; HEYMANN, J. B.; SCHENDEL, S. L.; DERIVY, B. N.; COHEN, F. S. Structure-function of the channel-forming colicins. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 24, p. 611-641, 2004.

- CURSINO, L.; SMARDA, J.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, p.185-195, 2002.
- 10

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotech.*, v. 13, p. 194-199, 2007.

- DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; LA FONTAINE, S.; ROOD, J. I. Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov., transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge 1941) to the genus *Dichelobacter* gen. nov. as *Dichelobacter nodosus* comb. nov.; and assignment of the genera *Cardiobacterium*, *Dichelobacter*, and *Suttonella* to *Cardiobacteriaceae* fam. nov. in the gamma division of Proteobacteria on the basis of 16S rRNA sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 40, p. 426-433, 1990.
- 15
- 20

DOBSON, A.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, p. 1-6, 2012.

- DORE, J.; SGHIR, A.; HANNEQUART-GRAMET, G.; CORTIER, G.; POCHART, P. Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal *Bacteroides* populations. *Sys. Appl. Microbiol.*, v. 21, p. 65-71, 1998.
- 25

- DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; MCMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 70, p.564-582, 2006.
- 30

- DUERDEN, D.I. Virulence factors anaerobes. *Clin. Infec. disea.*, v.18, p.253-259, 1994.
- DUNCAN, S. H.; CHIERICI, T.; ZIRAH, S. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int. J. Obes.*,v. 32, p. 1720-1724, 2008.
- 5 DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZON, D.; ZIRAH, S.; GOULARD, C.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Two Enzymes Catalyze the Maturation of a Lasso Peptide in *Escherichia coli*. *Chemistry & Biology.*, v. 14, p.793-803, 2007.
- DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZON, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod.*
 10 *Rep.*, v. 24, p. 708-734, 2007.
- FANARO, S.; CHIERICI, T.; GUERRINI, P. Intestinal microflora in early infancy: composition of development. *Acta Paediatr.*, v. 441, p. 48-55, 2003.
- FARIAS, L. M.; CARVALHO, N. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from
 15 marmosets. *Res. Microbiol.*, v. 143, n. 2, p. 151-9, 1992.
- FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H., MIRANDA, C. M.; CARVALHO, M. A.; DAMASCENO, C. A.; TAVARES, C. A.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C.Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragicillin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. *Res.*
 20 *Microbiol.*, v. 145, p. 9-16. 1994.
- FENNER, L.; ROUX, V.; MALLET, M. N.; RAOULT, D. *Bacteroides massiliensis* sp. nov, isolated from blood culture of newborn. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,v.55, p. 1335-1337, 2005.
- FILLE, M.; MANGO, M.; LECHNER, M.; SCHAUMANN, R. *Bacteroides fragilis*
 25 Group: Trends in Resistance. *Curr. Microbiol.*, v. 52, p.153-159, 2006.
- FLEURY, Y.; REVOL-JUNELLES, A. M.; MATHIS, R.; KRIER, F.; DELFOUR, A., LEFEBVRE, G. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins.*Lett. Appl. Microbiol.*,v. 23, p.120-124, 1996.

- FOGARTY, L. R.; VOYTEK, M. A. Comparison of bacteroides-prevotella 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 10, p. 5999-6007, 2005.
- 5 FOLLI, C.; RAMAZZINA, I.; ARCIDIACO, P.; BERNI, R. Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 221, p.143-149, 2003.
- FRENCH, G.L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 58, p. 1107-1117, 2006.
- 10 GABRIEL, I.; MALLET, S.; LECONTE, M.; FORT, G. Effects of whole wheat feeding on the development of coccidial infection in broiler chickens until market-age. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 129, p. 279-30, 2006.
- GALVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LOPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 120, p. 51-70, 2007.
- 15 GARCIA, G. D.; CARVALHO, M. A. R.; DINIZ, C. G.; MARQUES, J. L.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group strains recovered from broiler (*Gallus gallus domesticus*) feces. *Brit. Poult. Sci.*, v. 14, p. 123-131, 2012.
- GILLOR, O.; KIRKUP, B. C.; RILEY, M. A. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advanc. Appl. Microbiol.* v. 54, p. 129-146, 2004.
- 20 GILLOR, O.; ETZION, J. A. C.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.81, p. 591-606, 2008a.
- GILLOR, O.; VRIEZEN, J. A. C.; RILEY, M. A. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiol.*, v. 154, p. 1783-92, 2008b.
- 25 GILLOR, O.; KIRKUP, B. C.; RILEY, M. A. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiol.*, v. 9, p. 165-171, 2009.
- GILMORE, M. S.; FERRETI, J. J. The thin line between gut comensal and pathogen. *Science*, v. 299, p. 1999-2002, 2003.

- GODOY, V. G.; DALLAS, M. M.; RUSSO, T. A.; MALAMY, M. H. A role for *Bacteroides flagilis* neuraminidase in bacterial growth in two model systems. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 4415-4426, 1993.
- 5 GORDON, D. M.; RILEY, M. D.; PINOU, T. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *E. coli* from house mice. *Microbiol.*, v. 144, p. 2233-2240, 1998.
- GORDON, D. M.; O'BRIEN, C. L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiol.*, v. 152, p. 3239-3244, 2006.
- 10 GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol. Fill.*, v. 53, p. 1040-1, 1925.
- GRATIA, A.; FREDERICQ, P. Pluralité et complexité des colicines. *Internat. Chim. Biol.*, v. 23, p. 324-331, 1946.
- 15 GREEN, A. A.; HUGHES, W. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods Enzymol.*, v. 1, p. 67-90, 1955.
- GRONLUND, M. M.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; LEHTONEN, O.P.; ISOLAURI, E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch. Dis. Child.*, v. 83, p. 186-192, 2000.
- 20 HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v. 20, p. 641-648, 1975.
- HAMMOND, B. F.; LILLARD, S. E.; STEVENS, R. H. A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, v. 55, p. 686-691, 1987.
- 25 HASTINGS, J. W.; SAILER, M.; JOHNSON, K. L.; RAY, J. C.; VEDERAS, M. E. Characterization of leuconocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc*. *J. Bacteriol.*, v. 71, p. 185-195, 1991.
- HAVELAAR, A.H.; HAAGSMA, J.H.; MANGEN, M.J.J.; KEMMEREN, J.M.; VERHOEF, L. P. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 156, p. 231-238, 2012.

- HAYES, T. H.; CUNDY, K. R.; FERNANDES, P. B. Purification and Characterization of a Bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.*, v. 155, p. 1171-1177, 1983.
- 5 HÉCHARD, Y.; SAHL, H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie.*, v.84, p.545-557, 2002.
- HENG, N. C.K.; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M., editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer; Berlin: 2007. p. 45-92.
- 10 HOLDEMAN, L. V.; CATA, E. P; MOORE, W. E. C. Anaerobe laboratory manual, 4th ed. *Anaerobe Laboratory*, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
- HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. Taxonomy of anaerobes: present state of the art. *Rev. Infec. Dis.*, v. 6, p. 3-10, 1984.
- 15 HOOPER, L. V.; WONG, M. H.; THELIN, A.; HANSSON, L.; FALK, P. G. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, v. 291, p. 881-884, 2002.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, v. 336, p. 1268- 1270, 2012.
- 20 HOPKINS, M. J.; MACFARLANE, G.T. Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 1920-1927, 2003.
- HU, J.; MERY L.; DESMEULES, M.; MACLEOD, M. Canadian Cancer Registries Epidemiology. Diet and vitamin or mineral supplementation and risk of rectal cancer in Canada. *Acta Onc.*, v. 46, p. 342-54, 2007.
- 25 JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 59, p.171-200, 1995.
- JACOB, F.; LWAFF, A.; SIMINONVICH, A.; WALLMAN, E. Definition de quelques terms relatifs à la lysogenie. *Ann. Inst. Pasteur.*, v. 84, p. 222-224, 1953.

- JAMES, R.; LAZDUNSKI, C.; PATTUS, F. Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. *NATO ASI series*, Springer-Verlag, New York, v.8, p. 519, 1991.
- KANG, B. S.; SEO, J. G.; LEE, G. S.; KIM, J. H. Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *J. Microbiol.*, v. 47, p. 101-109, 2009.
- KASPER, D. L.; COHEN-PORADOSU, R. Infections due to mixed anaerobic organisms. In: FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E., KASPER, D. L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D. L. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, v. 1, ed. 17, p. 999-1006, 2008.
- KIM, Y. S.; MILNER, J. A. Dietary modulation of colon cancer risk. *J. Nut.*, v.137, p. 2576-2579, 2007.
- KIM, T. S.; HUR, J. W.; YU, M. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, v. 66, p. 3-12, 2003.
- KISIDAYOVA, S.; SIROKA, P.; LAUKOVA, A. Effect of nisin on two cultures of rumen ciliates. *Folia Microbiol.*, v. 44, p. 408-412, 2003.
- KITAHARA, M.; SAKAMOTO, M.; IKE, M.; SAKATA, S. *Bacteroides plebeius* sp. nov. and *Bacteroides coprocola* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 55, p.2143-2147, 2005.
- KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B.; HEDLUND, B. P.; PASTER, B. J.; STALEY, J. T.; WARD, N.; BROWN, D.; The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 4, 2011.
- KRUSZEWSKA, D.; SAHL, H. G.; BIERBAUM, G. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 54, p. 648-653, 2004.
- KULAGINA, E. V.; EFIMOV, B. A.; MAXIMOV, P. Y.; KAFARSKAIA, L. I.; CHAPLIN, A. V.; SHKOPOROV, A. N. Species composition of Bacteroidales order

bacteria in the feces of healthy people of various ages. *Bioscie. biotechnol. biochem.*, v. 96, p. 169-171, 2012.

KURODA, K.; KAGIYAMA, R. Biochemical relationship among three F-type pyocins, pyocin F1,F2, and F3, and phage KF1. *J. Biochem.*,v. 94, p. 1429-1441,
5 1983.

KUWARA, T.; XU, L.; ZENIG, J. Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, p. 14919- 14924, 2004.

KVERVA, M.; ZAKOSTELSKA, Z.; KLIMESOVA, K.; SOKOL, D.; HUDCOVIC, T.
10 Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clin. Exp. Immunol.*,v. 71, p. 345-360, 2010.

LAN, P.T.N.; SAKAMOTO, M.; SAKATA, S.; BENNO, Y. *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov.,
15 isolated from chicken caecum. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,v. 56, p. 2853-2859, 2006.

LAUKOVA, A.; GUBA, P.; NEMCOVA, R. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Dusseldorf by enterocin A in gnotobiotic Japanese quails. *Veterin. Medic. Czech.*,v. 49, p.47-51, 2004.

LEE, K. H.; PARKY, J. Y.; JEONG, S. J. Characterization of paraplantaricin C7, a
20 novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paraplantarum* C7 isolated from kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 17, p. 287-296, 2007.

LEE, D. G. Clinical significance of anaerobic infections. *Korean J. Intern. Med.*,v. 24, p. 11-20, 2009.

LENG, J.; XIE, L.; ZHU, R.; YANG, S.; GOU, X.; LI, S.; MAO, H. Dominant
25 bacterial communities in the rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Yaks (*Bos grunniens*) and Yunnan Yellow Cattle (*Bos taurus*) revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Mol. Biol. Rep.*,v. 21, p. 140-157, 2010

LESER, T. D.; AMENUVOR, J. Z.; JENSEN, T. K.; LINDECORONA, R. H.; BOYE, M.; MOLLER, K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig

gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 673-690, 2002.

LESTER, K.; SIMMONDS, R. S. Zoocin A and lauricidin in combination reduce *Streptococcus mutans* growth in a multispecies biofilm. *Caries Res.*, v.46, p. 185-193, 2012.

LEVISOHN, R.; KONISKY, J.; NOMURA, M. Interaction of colicins with bacterial cells. IV. Immunity breakdown studied with colicins Ia and Ib. *J. Bacteriol.*, v.96, p. 811-821, 1967.

LEVISON, M.E.; LEVISON, J.H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 23(4), p.791-815, 2009.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LI, M.; SONG, C. F.; PANG, X. M.; YANG, Y.; WANG, J. S. Molecular diversity of *Bacteroides* spp. in human fecal microbiota as determined by group-specific 16S rRNA gene clone library analysis. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 32, p. 193-200, 2009.

LIMA, F. L.; FARIAS, F. F.; CARVALHO, M. A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M. Influence of abiotic factors on the bacteriocinogenic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Res. Microbiol.*, v. 153, p. 249-252, 2002.

LIMA, F. L.; CARVALHO, M. A. R.; APOLONIO A. C.; BEMQUERER M. P.; SANTORO, M. M.; OLIVEIRA, J. S.; FARIAS, L. M. Actinomycetemcomitin: a new bacteriocin produced by *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 103-110, 2008.

LIU, C.; SONG, Y.; MCTEAGUE, M.; VU, A.W.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S.M. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using 350 group- and species-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 222, p. 9-16. 2003.

LOPEZ, I.; LOPEZ, R.; SANTAMARIA, P.; TORRES, C. Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. *Vitis*, 2007.

- LÜCKE, F.K. Utilization of microbes to process and preserve meat, *Meat Sci.*,v.56, p. 105-115, 2000.
- MAHOWALD M. A.; REY, F. E.; SEEDORF, H.; TURNBAUGH, P. J.; FULTON, R. S.; SHAH, N. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla.*Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 14, p. 5859-5864, 2009.
- MAJEED, H.; GILLOR, O.; KERR, B.; Riley, M.A. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J.*,v. 5, p. 71-81, 2011.
- MARTINEZ, B.; FERNNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiol.*, v.145, 3155-3161, 1998.
- MARTINEZ, I.; DUFFY, P. R.; SCHLEGEL, V. L.; WALTER, J. Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects. *PLos One*, v. 5, p. 179-189, 2010.
- MARCHESI, J. R. Prokaryotic and eukaryotic diversity of the human gut. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 72, p. 43-62, 2010.
- MATSUI, H.; KATO, Y.; CHIKARAISHI, T.; MORITANI, M.; WAKITA, M. Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species. *Anaerobe*, v. 16, p. 83-93, 2010.
- MAZMANIAN, S. K.; LIU, C. H.; TZIANABOS, A. O.; KASPER, D. L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*,v. 122, p. 107-118, 2005.
- MAZMANIAN, S. K.; KASPER, D. L. The love–hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6, p. 849-858, 2006.
- MCFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v. 12, p. 193-207, 2000.

- MENDOZA, T.; LUGO-REYES, S. O.; TERAN, L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immun.*, v.135, p. 1-11, 2010.
- MERCER, A. A.; MORELLI, G.; HEVZENROEDER, M.; KAMKE, M.; ACHTMAM, M. Conservation of plasmids among *Escherichia coli* K-1 isolates of diverse origin. *Infect. Immun.*, v. 46, p. 649-657, 1984.
- MICHEL-BRIAND, Y.; BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.*, v. 84, p. 499-510, 2002.
- MIDDELBOS, I. S.; VESTER, B. M., QU, A.; WHITE, B. A. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLos One*, v. 5, p. 97-100, 2010.
- MINAMIKAWA, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; YAMAZAKI, K. Purification and characterization of Warnericin RB4, anti-Alicyclobacillus; bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri*. *Curr. Microbiol.*, v. 51, p. 22-26, 2005.
- MIRANDA, C. M.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A.; DAMASCENO, C. A.; TOTOLA, A. H. , TAVARES, C. A. , CISALPINO, E. O.; VIEIRA, C. E. Purification and partial characterization of a bacteriocin isolated from *Bacteroides ovatus* H47. *Can. J. Microbiol.*, v.39, p. 169-174, 1993.
- MOORE, L. V. H.; MOORE, W. E. C. *Oribaculum catoniae* gen. nov., sp. nov.; *Catonella morbi* gen. nov., sp. nov.; *Hallellaseregens* gen. nov., sp. nov.; *Johnsonella ignava* gen. nov., sp. nov.; and *Dialister pneumosintes* comb. nov., nom. rev., anaerobic gram-negative bacilli from the human gingival crevice. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 10, p.187-192, 1984.
- MORENCY, H.; MOTA-MEIRA, M.; LAPONTE, G.; LACROIX, C.; LAVOIE, M. C. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can. J. Microbiol.*, v. 47, p. 322-331, 2001.
- MOSSIE, K. G.; JONES, T. D.; ROBB, F. T.; WOODS, D. R. Characterization and mode of action of a bacteriocin produced by a *Bacteroides fragilis* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.16, p. 724-730, 1979.

- MOTA-MEIRA, M.; MORENCY, H.; LAVOIE, M. C. In vivo activity of mutacin B-Ny266. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 56, p. 869-871, 2005.
- MURIANA, P.M., KLAENHAMMER, T.R. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p.114-121, 1991.
- MURINDA, E. S.; ROBERT, R. F. Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains including serotype O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 3196-3202, 1996.
- NAGAO, J. I.; ASADUZZAMAN, S. M.; ASO, Y. Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 102, p. 139-149, 2006.
- NAKAMURA, T.; FUJIMURA, S.; OBATA, N.; YAMAZAKI, N. Bacteriocin-like substance (melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect. Immun.*, v. 31, p. 28-32, 1981.
- NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J. Survey of antimicrobial susceptibility patterns of the bacteria of the *Bacteroides fragilis* group isolated from the intestinal tract of children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 99, p. 319-324, 2004.
- NAKANO, V.; PIAZZA, R. M. F.; CIANCIARULLO, V.; BUERIS, M. F.; SANTOS, M. A.; WEXLER, H.; AVILA-CAMPOS, M. J. Adherence and invasion of Bacteroidales isolated from the human intestinal tract. *Clin. Microbiol. Infec.*, v. 14, p. 955-963, 2008.
- NAKANO, V.; SILVA, A. N.; MERINO, V. R. C.; WEXLER, H.; AVILA-CAMPOS, M. J. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. *Clinics*, v.4, p. 543-547, 2011.
- NAKAYAMA, K.; TAKASHIMA, K.; ISHIHARA, H. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.*, v. 38, p. 213-231, 2000.
- NES I.F.; DIEP D.B.; HÅVARSTEIN L.S.; BRURBERG M.B.; EIJSINK V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhock*, v. 70, p.113-128, 1996.

- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v. 9, p. 255-262, 1988.
- 5 NISHIE, M.; NAGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol. Sci.*, v. 17, p. 1-16, 2012.
- OHMOMO, S.; MURATA, S.; KATAYAMA, N.; NITINPRASART, S., KOBAYASHI, M.; NAKAJIMA, T.; YAJIMA, M.; NAKANISHI, K. Purification and some
10 characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 81-89, 2000.
- OLSEN, K. N.; HENRIKSEN, M.; BISGAARD, M.; NIELSEN, O.L.; CHRISTENSEN, H. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.
15 94, p. 423-437, 2008.
- ONDA, T.; YANAGIDA, F.; TSUJI, M.; SHINOHARA, T.; YOKOTSUKA, K. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* spp. Strain GM005, isolated from miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 87, p. 153-159, 2003.
- 20 OPPEGARD, C.; FIMLAND, G.; THORBEEK, L.; NISSEN-MEYER, J. Analysis of the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, p. 2931-2938, 2007.
- O'SHEA, E. F.; O'CONNOR, P. M.; RAFTIS, E. J. Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus*
25 *salivarius*. *J. Bacteriol.*, v. 24, p. 6973-6982, 2011.
- OTTOMAN, N.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; BELZER, C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do?. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, v. 2, p. 104-115, 2012.

- PANG, X.; DING, D.; WEI, G.; ZHANG, M.; WANG, L.; ZHAO, L. Molecular profiling of *Bacteroides* spp. in human feces by PCR-temperature gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, v. 61, p. 413-417, 2005.
- PAPASTATHOPOULOU, A.; BEZIRTZOGLU, E.; LEGAKIS, N.J.
5 *Bacteroides fragilis*: Production and sensitivity to bacteriocins. *Anaerobe*, v. 3, p. 203-206, 1997.
- PARK, S.H.; ITOH, K.; FUJISAWA, T. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p.294-300, 2003.
- 10 PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C. Factors influencing the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, v.118, p.511-521, 2006.
- PINGITORE, E. V.; SALVUCCI, E.; SESMA, F. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). *Top.Trends Appl. Microbiol.*,v. 145, p. 144-152, 2007.
- 15 PIVA, A. & HEADON, D. R. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiol.*,v. 140, p. 697-702, 1994.
- PONS, A.M.; ZORN, N.; VIGNON, D.; DELALANDE, F.; VAN DOR SSELAEER, A. Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 46, p. 229-230, 2002.
- 20 PRASAD, S.; MORRIS, P.C.; HANSEN, R.; MEADEN, P.G.; AUSTIN, B. A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Microbiol.*,v. 151, p. 3051-3058, 2005.
- PRUZZO, C.; GUZMAN, C.A.; DAINELLI, B. Incidence of haemagglutination activity among pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* strains and
25 role of capsule and pili in HA and adherence. *FEMS Microbiol. Lett.*,v. 59, p. 113-118, 1989.
- RAUTIO, M.; EROLA, E.; V.; MOLITORIS, D.; LAWSON, P.; COLLINS, M. D. Reclassification of *Bacteroides putredinis* (Weinberg et al. 1937) in a new genus *Alistipes* gen. nov., as *Alistipes putredinis* comb. nov., and description of

Alistipes finegoldii sp. nov., from human sources. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 182-188, 2003.

5 REA, M. C.; GUZMAN, C.A.; DAINELLI, B. Effect of broad and narrow spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, p. 4639-4644, 2011.

10 RIBEIRO-RIBAS, R. N.; VIEIRA, M.A.R.; APOLONIO, C.A., MAGALHAES, P.P.; OLIVEIRA, J.S.; FARIAS, L.M. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by an oral *Fusobacterium nucleatum* isolated, *J. Appl. Microbiol.*, v.7, p. 145-152, 2008.

RICHARDS, J. D.; GONG, J.; DE LANGE, C. F. M. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 85, p. 421-435, 2005.

15 RIGOTTIER-GOIS, L.; ROCHET, V.; GARREC, N.; SUAUA, A.; DORE, J. Enumeration of *Bacteroides* species in human faeces by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 110-118, 2003.

20 RILEY, T. V.; MEE, B. J. A Bacteriocin Typing Scheme for *Bacteroides*. *J. Med. Microbiol.*, v.15, p. 387-391, 1982.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.*, v. 84, p. 357-64. 2002.

RILEY, M. A. Bacteriocin-Mediated Competitive Interactions of Bacterial Populations and Communities. *Prokar. Antimicr. Pept.*, p. 13-26, 2011.

25 ROCHA, E. R.; SMITH, C. J. Regulation of *Bacteroides fragilis katB* mRNA expression by oxidative stress and carbon limitation. *J. Bacter.*, v. 179, p. 7033-7039, 1997.

RUDEK, W.; HAQUE, R. Extracellular enzymes of the genus *Bacteroides*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 4, p. 458-460, 1976.

- RYAN, M. P.; FLYNN, J.; ROOS, R. P.; MEGNEY, W. J. The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 82, p. 2625-2631, 1998.
- 5 SACK, R. B.; ALBERT, M. J.; ALAM, K.; NEOGI, P. K.; AKBAR, M. S. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 960-963, 1994.
- SAKAMOTO, M. Recent classification of the genus *Bacteroides* and related taxa. *Microbiol. Cult. Coll.*, v. 23, p.11-16, 2007.
- 10 SAKAMOTO, M.; SUSUKI, M.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 52, p. 841-849, 2002.
- SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*,
 15 *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 56, p. 1599-1605, 2006.
- SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M.; BENNO, Y. *Parabacteroides johnsonii* sp. nov.,
 20 isolated from human faeces. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.57, p. 293-296, 2007.
- SAKAMOTO, M.; SUZUKI, N.; MATSUNAGA, N.; KOSHIHARA, K.; SEKI, M.; KOMIYA, H.; BENNO, Y. *Parabacteroides gordonii* sp. nov., isolated from human blood cultures. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 59, p. 2843-2847, 2009.
- 25 SALANITRO, J. P.; BLAKE, I. G.; MUIRHEAD, P. A. Studies on the cecal microflora of commercial broiler chickens. *Appl. Microbiol.*, v. 28, p. 439-447, 1974.
- SALYERS, A. A. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 33, p. 319-322,
 30 1984.

- SANTOS, S. G.; SERUFO, J. C.; SILVA, R. A.; MARRA, B. A.; REIS, C. M.; HAMDAN, J. S.; NICOLI, J. R.; CARVALHO, M. A.; FARIAS, L. M. Microbiologic profile of intra-abdominal infections at Belo Horizonte, Brazil. *AM. J. Infect. Control.*, v.31, p. 135-143, 2003.
- 5 SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, v.166, p. 368-79. 1987.
- SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends*
- 10 *Food Sci. Technol.*, v. 7, p. 158-164, 1996.
- SCHMITT-WAGNER, D.; FRIEDRICH, M. W.; WAGNER, B. Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 6007-6017, 2003.
- 15 SCHOLTENS, P. A.; OOZEER, R.; MARTIN, R. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annual Rev. food Scie. Technol.*, v. 3, p. 425-447, 2012.
- SCUPHAM, A. J.; PATTON, T. G.; BENT, E.; BAYLES, D. O. Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. *Microbial Ecol.*, v. 56, p. 322-331, 2008.
- 20 SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 121, p.123-138, 2008.
- SEVERINOV, K.; SEMENOVA, E.YUZENKOVA, Y.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Structure-activity analysis of microcin J25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *J.*
- 25 *Bacteriol.*, v. 187, p. 3859-3863, 2007.
- SHAH, H.N.; COLLINS, H.D. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus *Porphyromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 38, p.128-131, 1988.

- SHAH, H. N.; COLLINS, H. D. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.39, p.85-87, 1989.
- SHAH, H. N.; COLLINS, H. D. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 40, p. 205-208, 1990.
- SAHL, H. G.; BIERBAUM, G. Multiple activities in natural antimicrobials. *Microbe*, v. 3, p. 467-473, 2008.
- SAR C.; MWENNYA, B.; PEN, B.; MORIKAWA, R. Effect of nisin on ruminal methane production and nitrate/nitrite reduction *in vitro*. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 56, p. 803-810, 2005.
- SHAH, H. N.; OLSEN, I., BERNARD, K., FINEGOLD, S. M. Approaches to the Study of the Systematics of Anaerobic, Gram-negative, Non-sporeforming Rods: Current Status and Perspectives. *Anaerobe*, v. 15, p.179-194. 2009.
- SHAND, R.; PRICE, L.; O'CONNOR, E. M. Halocins: protein antibiotics from hypersaline environments. In: OREN, A. (Ed.) *Microbiol. Biogeochem. Hypers. Environm.*, p. 295-306, 1998.
- SHARP, S .E. Commensal and pathogenic microorganisms of humans. In: MURRAY, P.R. et al., *Manual of Clinical Microbiology*. 7nd ed. Washington: *American Society for Microbiology Press*, p. 23-32, 1999.
- SILVA, V. L., DINIZ, C. G.; SANTOS, S. G., GOMES, R. M. F.; NICOLI, J. R.; MAGALHAES, P. P. Physiological alterations of a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. *J. Appl. Microbiol.*, v.103, p.20-26, 2007.
- SMARDA, J.; SMAJS, D. Colicins: exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Fol. Microbiol.*, v. 43, p. 563-582, 1998.
- SMITH, C. J.; ROCHA, E. R.; PASTER, B. J. The medically important *Bacteroides* spp. in health and disease. *Prokaryotes*, v. 3, p. 11-19, 2006.
- SNYDMAN, D. R.; NAGAMINE, T.; OGATA, K. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the

United States from 1997 to 2004. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 1649-1655, 2007.

SONG, Y. L.; LIU, C. X.; MCTEAGUE S.; FIEGOLD, M. *Bacteroides nordii* sp. nov. and *Bacteroides salyersae* sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 55-65, 2004.

SOUSA, M. A. B; MENDES, E. N.; APOLONIO, A. C.M.; FARIAS, L. M.; MAGALHAES, P. P. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhea. *J. Compilation*, v. 118, p. 125-135, 2010.

SOUTHERN, J. A.; KATZ, W.; WOODS, D. R. Purification and properties of a cell-bound bacteriocin from a *Bacteroides fragilis* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.25, p. 253-257, 1984.

STACHURA, I.; MCKINLEY, F. W.; LEIDY, G. Incomplete bacteriophage-like particles in ultraviolet-irradiated haemophilus. *J. Bacteriol.*,v. 98, p. 818-820, 1969.

STRAUCH, E.; KASPAR, H.; SCHAUDINN, C. Analysis of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 529, p. 249-251, 2003.

SVETOCH, E. A.; STERN, N. J.; ERUSLANOV, B. V. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. *J. Food Protec.*, v. 68, p.11-17, 2005.

SVETOCH, E. A.; STERN, N. J.; ERUSLANOV, B. V. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*,v. 77, p. 2749-2754, 2011.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v. 40, p. 722-56, 1976.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; OGATA, K.; NAKAMURA, M. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiol. Lett.*,v. 29, p. 159-169, 1999.

- TALLY, F.P.; GOLDIN, B.R.; JACOVUS, N.V.; GORBACH, S.L.: Superoxide Dismutase in Anaerobic Bacteria of Clinical Significance. *Infect. Immun.*, v. 16, p. 20-25, 1977.
- 5 TAN, H.; LI, T.; ZHU, C.; ZHANG, X.; WU, M.; ZHU, X. *Parabacteroides chartae* sp. nov., an obligately anaerobic species from wastewater of a paper mill. *Intern. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, v. 62, p. 2613-2617, 2012.
- TEN BRINK, B., MINEKUS, M., VAN Der VOSSEN, J. M., LEE, R. J & VELD, J.H. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus*
- 10 *acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 77, p.140-148, 1994.
- THUM, C.; COOKSON, A. L.; OTTER, D. E.; MCNABB, W. C.; HODGKINSON, A. J.; DYER, J.; ROY, N. C. Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract?. *J. Nutrit.*, v. 11, p. 1921-1928, 2012.
- 15 TIWARI, S. K.; SRIVASTAVA, S. Statistical optimization of culture components for enhanced bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Food Biotechnol.*, v. 22, p.64-77, 2008.
- TUÑÓN, P.; JOHANSSON, K. E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gel. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.
- 20 9, p. 171-179, 1984.
- TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, v. 444, p. 1027-1031, 2006.
- TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGET, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. *Nature*, v. 449, p.
- 25 804-810, 2007.
- TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, v. 457, p. 480-485, 2009.
- TURNER, J. W.; JORDAN, H. V. Bacteriocin-like activity within the genus *Actinomyces*. *J. Dental Res.*, v. 60, p. 1000-1007, 1981.

- TZIANABOS, A. O.; ONDERDONK, A. B.; ROSNER, B.; CISNEROS, R. L.; KASPER, D. L. Structural features of polysaccharides that induce intra-abdominal abscesses. *Science*, v. 262, p. 416-419, 1993.
- UTENG, M.,; HAUGE, H. H.,; BRONDZ, I., NISSEN-MEYER, J.; FIMLAND, G.
- 5 Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture. *Lett Appl. Microbiol.*, v. 24, p. 488-492, 2002.
- VALEFF, Carolina Nicolai. *Extração, purificação e sequenciamento de bacteriocina produzida por Fusobacterium necrophorum*. 2011. 90f. Dissertação
- 10 (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- VIEIRA, Carolina Araújo. *Avaliação da produção de substância(s) tipo-bacteriocina(s) por Fusobacterium necrophorum*. 2008. 81f. Dissertação
- 15 (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- VIPPERLA, K.; O'KEEFE, S. J. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutrition Clinical Practice*, v. 5, p. 624-635, 2012.
- WALSTAD, D. L.; REITZ, R. C.; SPARLING, P. F. Growth inhibition among strains of *Neisseria gonorrhoeae* due to production of inhibitory free fatty acids and
- 20 lysophosphatidylethanolamine: absence of bacteriocins. *Infect. Immun.*, v.10, p. 481-488, 1974.
- WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 20, p.593-621, 2007.
- WHITFORD, M. F.; MCPHERSON, M. A.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M.
- 25 Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 569-574, 2001.
- WISE, M. G.; SIRAGUSA, G. R. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to threeweek-old commercially reared broiler chickens fed

- conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J. Appl. Microbiol.*, v. 102, p. 1138-1149, 2007.
- WOLTMANN, A.; GANGLOFF, S.C.; BRUCH, H.Y.P; RIETSCHEL, E.T.;
 5 WERNER, S.; SILVER, J.; GOYERT, S.M. Reduced bacterial dissemination and
 liver injury in CD14-deficient mice following a chronic abscess-forming peritonitis
 induced by *Bacteroides fragilis*. *Med. Microbiol. Immun.*, v.187, p.149-146, 1999.
- WU, J.; HU, S.; CAO, L. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in
 lactating cows. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 3131-3135, 2007.
- WYBO, I.; LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M. Third Belgian multicentre survey of
 10 antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 59, p.
 132-139, 2007.
- XU, J., BJURSELL, M. K.; HIMROD, J., DENG, S.; CARMICHAEL, L. K. A
 genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science*, v.
 299, p. 2074-2076, 2003.
- 15 XU, J.; MAHOWALD, M. A.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.;
 MARTENS, E. C.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M., MINX, P.; LATREILLE, P.
 Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biology*, v. 5,
 p. 156-162, 2007.
- YAMAMOTO, Y.; TOGAWA, Y.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. Purification and
 20 characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain
 RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 5746-5753, 2003.
- YEGANI, M.; KORVER, D. R. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult
 Sci.* v. 10, p. 2052-2063, 2008.
- ZOETENDAL, G.E.; RAJILIC-STOJANOVIC M.; VOS, W. M. High-throughput
 25 diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, v.
 11, p. 1605-1615, 2004.
- ZHU, X. Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y.; JOERGER, R. D. 16S rRNA based analysis
 of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p.
 124-137, 2002.

ZHU, X. Y.; JOERGER, R. D. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with groupspecific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Poult. Sci.*,v. 82, p. 1242-1249, 2003.