

Mireille Ângela Bernardes Sousa

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Shigella*:
PESQUISA, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE UMA NOVA BACTERIOCINA**

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

Belo Horizonte

2010

Mireille Ângela Bernardes Sousa

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Shigella*: PESQUISA, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA BACTERIOCINA**

Tese apresentada no 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 Doutor em Microbiologia

ORIENTADORES

Paula Prazeres Magalhães

Edilberto Nogueira Mendes

Luiz de Macêdo Farias

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

Belo Horizonte

2010

COLABORAÇÃO

Prof. Marcelo Matos Santoro
Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG

Ana Carolina Moraes Apolônio
Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

The Academy of Sciences for the Developing World (TWAS)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG)

Dedico este trabalho a todos os profissionais da saúde, que trabalham com o objetivo comum de minimizar a dor e contribuir de para salvar vidas.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht.

AGRADECIMENTOS

Neste momento tão importante e de grande alegria pela conclusão desta etapa, deixo o meu “MUITO OBRIGADA!” a todos os que me apoiaram durante esta trajetória. Certamente os meus agradecimentos ainda não serão o bastante considerando toda contribuição que tive direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho.

Início agradecendo a Deus pelo dom da dedicação e perseverança, principalmente naqueles momentos em que parecia que os objetivos deste trabalho ainda estavam muito longe de serem alcançados.

A minha orientadora, Profa. Paula Prazeres Magalhães, pela confiança em mim depositada, pela dedicação na orientação deste trabalho e por toda atenção e carinho que recebi nestes anos de convivência. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Luiz de Macêdo Farias, por acompanhar o desenvolvimento deste trabalho e pelo entusiasmo com cada resultado obtido.

Ao Prof. Edilberto Nogueira Mendes, pela atenção, confiança e apoio na realização deste trabalho.

À Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho pela atenção com que me recebeu no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

À Simone pela atenção e amizade e à Ana Carolina pela colaboração.

Ao Jamil pela contribuição durante as etapas de purificação.

À Profa. Andrea Maria Amaral Nascimento e à Cláudia, pela colaboração nos experimentos relacionados à biologia molecular.

A todos que contribuíram na avaliação deste trabalho, desde à etapa do projeto, exame de qualificação, revisão da tese e aos componentes da banca examinadora pela disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios pela amizade e pela torcida durante a realização dos experimentos. Obrigada a todos por fazer deste laboratório um ambiente de trabalho muito agradável. Agradeço em especial à Patrícia, à Jaqueline e à Daniela por tudo que fizeram por mim. Sem vocês tudo teria sido bem mais difícil.

Aos colegas do laboratório de Diagnóstico Genético das Doenças Infecciosas, pela contribuição na extração e dosagem de DNA, pela receptividade e atenção com que me receberam de volta ao laboratório.

Ao José Sérgio e Luzia por tudo, principalmente pelo carinho e atenção que sempre me dedicaram.

Ao Prof. Cláudio Bonjardim, coordenador do programa de pós-graduação em Microbiologia do ICB/UFMG e aos secretários do Programa de Pós-graduação, em especial ao Douglas pela atenção.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia do ICB/UFMG pelos ensinamentos durante a realização das disciplinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a The Academy of Sciences for the Developing World (TWAS), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG) pelos recursos financeiros disponibilizados, essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório Hermes Pardini, em especial ao Antônio Eustáquio de Souza e a todos os amigos do setor de Microbiologia que acompanharam de perto meu trabalho, sempre me estimulando com palavras de incentivo e compreendendo minha “correria”.

Aos meus irmãos e a todos os familiares que sempre torceram por mim, em especial ao Luiz Alberto.

Aos meus queridos pais, pelo amor incondicional, pela compreensão e por sempre me apoiarem nos momentos em que tudo parecia mais difícil.

Aos meus sobrinhos Maria Fernanda, Álvaro, Leonardo, Emanuelle, Joana Paula, Vítor e Arthur pelo carinho e presença tão importante em minha vida.

Ao Alessandro, pelo amor, companheirismo, amizade, apoio e compreensão.

Em especial ao meu querido Henrique, por todo amor e carinho, por ter sido meu porto seguro durante esta trajetória e por ser motivo de tantos momentos de afeto e descontração.

Termino por deixar o meu “MUITO OBRIGADA!” a todos aqueles que sempre estiveram presentes em minha vida, familiares, amigos e colegas, cujos nomes não foram citados, mas que torceram e acreditaram em mim e a todos que de alguma forma utilizarem este trabalho.

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	14
Diarreia infecciosa aguda	15
<i>Shigella</i>	16
Ecologia microbiana intestinal	19
Bacteriocinas	20
JUSTIFICATIVA	26
OBJETIVOS	28
Objetivo geral	29
Objetivos específicos	29
ARTIGOS CIENTÍFICOS	30
Artigo 1 – Publicado no periódico <i>APMIS</i> Bacteriocin production by <i>Shigella sonnei</i> isolated from faeces of children with acute diarrhoea	31
Artigo 2 – Publicado no periódico Mem Inst Oswaldo Cruz Antagonistic activity expressed by <i>Shigella sonnei</i> : identification of a putative new bacteriocin	43
Artigo 3 – A ser submetido Phenotypic and genotypic evaluation of bacteriocinogeny in <i>Shigella sonnei</i> and <i>Shigella flexneri</i> strains	50
DISCUSSÃO	66
SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

A produção de bacteriocinas por *Shigella sonnei*, importante agente etiológico de diarreia inflamatória, ativas contra o organismo, outras bactérias diarreio gênicas e membros da microbiota intestinal foi investigada. Mais da metade das amostras expressaram isoantagonismo e heteroantagonismo contra patótipos diarreio gênicos e *Escherichia coli* e *Shigella flexneri*, sugerindo que a habilidade pode contribuir para a virulência da bactéria. A fração intracelular precipitada com 75% de sulfato de amônio mostrou-se resistente a valores extremos de pH e permanece ativa após armazenamento a -80°C por mais de 2 anos. A sensibilidade a proteases e a termolabilidade reforçam a hipótese de que a substância antagonista é uma bacteriocina. A substância antimicrobiana foi purificada, a massa molecular da proteína foi estimada por espectrometria de massas em 18,56kDa e sua sequência N-terminal não apresentou 100% de identidade com nenhuma proteína com atividade antimicrobiana descrita. É possível que a bacteriocina represente uma *nova* proteína ou uma proteína já descrita com uma *nova* atividade. Para avaliação fenotípica e genotípica de bacteriocinogenia, foram estudadas amostras de *S. sonnei* e *S. flexneri*, empregando-se, como reveladoras, amostras de *E. coli* K12 Row sem plasmídeo e transformantes que albergavam plasmídios bacteriocinogênicos, especialmente os plasmídios ColE4 e ColE7, e mais de 90% delas, múltiplos determinantes. Os dados demonstram que bacteriocinogenia é uma habilidade comum entre *S. sonnei* e *S. flexneri*, reforçando a hipótese de que a característica represente vantagem seletiva para a bactéria.

Palavras-chave: bacteriocina, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, substância antagonista, diarreia infecciosa aguda.

ABSTRACT

Shigella is a common agent of inflammatory diarrhea worldwide. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* employing the organism, other diarrheogenic bacteria, and members of the intestinal microbiota as indicator strains was evaluated. Over half of the strains expressed isoantagonism and heteroantagonism against *Shigella flexneri* and diarrheogenic *Escherichia coli*, indicating that bacteriocinogeny may represent a virulence factor for the bacterium. The intracellular fraction precipitated at 75% ammonium sulphate kept active following exposure to extreme pH values and maintenance at -80°C for two years and was inactivated by high temperatures and proteases. After sequential steps of chromatography the molecular mass of the bacteriocin was estimated by mass spectrometry as 18,56 kDa. The N-terminal sequence of the bacteriocin did not match any other antibacterial protein described. The bacteriocin may represent a newly described protein or a already described protein with a newly detected function. Considering that *S. sonnei* producer strain showed antagonistic activity against diarrheogenic bacteria a potential clinical applicability for the bacteriocin either for preventing or controlling diarrheal disease may be previewed. We also addressed bacteriocinogeny in *S. sonnei* and *S. flexneri* strains against *E. coli* K12Row and *E. coli* transformant strains carrying different bacteriocin plasmids by employing phenotypic and genotypic methods. Almost 40% of bacterial isolates expressed antagonism. All *Shigella* isolates harbor at least one bacteriocin determinant especially ColE4 and ColE7 plasmids, and more than 90% showed multiple bacteriocin genes. Data generated by this investigation confirms that bacteriocinogeny is a widespread ability among *S. sonnei* and *S. flexneri* and argues in favor of a key role for the phenomenon in mediating bacterial dynamics.

Keywords: bacteriocin, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, antagonistic substance, acute infectious diarrhea.

INTRODUÇÃO

DIARREIA INFECCIOSA AGUDA

Diarreia é a apresentação clínica mais comum da enterite infecciosa. Envolve alterações do trânsito intestinal habitual e pode ser acompanhada por náusea, vômito, tenesmo, dor abdominal, febre e desidratação, entre outras manifestações. É considerada causa importante de morbidade em crianças, sendo suplantada, em termos de prevalência, apenas por infecções do trato respiratório. Em países em desenvolvimento, estima-se a ocorrência de 2 a 4 bilhões de casos por ano e de 2,2 milhões de óbitos. São acometidas, mais frequentemente, crianças com até 5 anos de idade. Nesta faixa etária, a doença é responsável por cerca de 1,9 milhões de óbitos, o que corresponde a, aproximadamente, 20% do total anual de óbitos (Medeiros *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2001; Boschi-Pinto *et al.*, 2008; Navaneethan & Gianella, 2008).

Vírus, bactérias e protozoários são reconhecidos como agentes de enterite infecciosa aguda. *Rotavirus* é o microrganismo mais comumente envolvido na etiologia da doença, especialmente em crianças. Entre as bactérias, deve-se mencionar *Shigella*, *Salmonella enterica*, o grupo diarreiogênico de *E. coli* (patotipos enterotoxigênico, enteropatogênico, produtor de toxina shiga, enteremorrágico, enteragregativo, enterinvasivo e de aderência difusa), *Campylobacter*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia enterocolitica*. Entre os protozoários, merecem destaque *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli* e *Cryptosporidium parvum* (Dellert & Cohen, 1994; Nataro & Kaper, 1998; Aranda-Michel & Gianella, 1999; Cimerman *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2001; Navaneethan & Gianella, 2008).

A diarreia de origem infecciosa pode ser classificada, do ponto de vista clínico e fisiopatológico, como inflamatória e não inflamatória. Na maioria das vezes, é autolimitada, não havendo necessidade de tratamento com drogas antimicrobianas. A diarreia não inflamatória acomete, habitualmente, o intestino delgado e está relacionada com diminuição da absorção e aumento da secreção de fluidos e eletrólitos. Em consequência, o paciente apresenta quadro caracterizado por eliminação de grande volume de fezes aquosas, sem sangue e pus, e ausência de febre. Os principais agentes bacterianos deste tipo de

diarreia, *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteropatogênica e *V. cholerae*, induzem alteração do hábito intestinal, principalmente, por meio da produção de enterotoxinas ou por diminuição da superfície absorptiva do intestino delgado. A diarreia inflamatória caracteriza-se por eliminação de fezes em pequeno volume, com sangue e pus, sendo frequentemente acompanhada por febre, dor abdominal intensa e tenesmo. Está associada principalmente aos patótipos enterinvasivo, produtor de toxina shiga e enteremorrágico de *E. coli*, *Shigella*, *S. enterica* e *Campylobacter*. Estes microrganismos aderem ao epitélio intestinal e são capazes de invadir os enterócitos ou a profundidade da mucosa, produzir citotoxinas e estimular a liberação de citocinas e outros mediadores químicos (Ohl & Miller, 2001; Ina *et al.*, 2003; Jennison & Verma, 2004; Svensson *et al.*, 2004; Navaneethan & Gianella, 2008).

Shigella

Os microrganismos do gênero *Shigella*, membros da família Enterobacteriaceae, são responsáveis pela disenteria bacilar (Frankel *et al.*, 1990; Rezwan *et al.*, 2004; Nataro *et al.*, 2007). O gênero inclui quatro espécies, diferenciadas com base em características bioquímico-fisiológicas e antigênicas: *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* (Noriega *et al.*, 1995; Jennison & Verma, 2004; Kingombe *et al.*, 2005; Thong *et al.*, 2005; Nataro *et al.*, 2007).

Os representantes do gênero *Shigella* invadem a mucosa do cólon, replicam-se e disseminam-se entre os enterócitos, induzindo reação inflamatória aguda com consequente destruição epitelial. O organismo apresenta habilidades de virulência diversificadas, codificadas por genes localizados no cromossomo ou no plasmídio de invasão (Al-Hasani *et al.*, 2001a; Al-Hasani *et al.*, 2001b; Fernandez & Sansonetti, 2003; Wei *et al.*, 2003; Jennison & Verma, 2004; Parsot, 2005).

O processo de invasão é muito complexo e envolve a ação coordenada de diversos efetores bacterianos. Amostras de *Shigella* são incapazes de invadir os enterócitos pela superfície apical, penetrando na mucosa do cólon pelas células M do epitélio associado a folículos linfóides. As bactérias liberadas pela superfície

basal das células M, após serem fagocitadas, podem induzir apoptose de macrófagos, o que evita a lise bacteriana e recruta neutrófilos polimorfonucleares, que lesam a barreira epitelial, facilitando o acesso da bactéria à superfície basolateral dos enterócitos. No interior destas células, os organismos induzem polimerização de actina com consequente formação de protrusões da membrana celular, disseminando-se horizontalmente pela camada epitelial (Fernandez & Sansonetti, 2003; Jennison & Verma, 2004; Parsot, 2005).

Além da capacidade de invasão, *S. dysenteriae* produz toxina shiga, uma exotoxina que é liberada durante a lise da célula. A toxina shiga bloqueia a síntese proteica, agindo especificamente na subunidade 60S de ribossomos. Existem evidências de que o efeito primário da toxina no cólon seja o dano aos vasos sanguíneos, causando trombose capilar e inflamação e, em consequência, colite hemorrágica. A toxina desempenha, ainda, papel central na patogênese da síndrome hemolítico-urêmica, induzindo lesão endotelial e alteração da função plaquetária (Vargas *et al.*, 1999; Fernandez & Sansonetti, 2003).

Como mencionado anteriormente, *Shigella* induz diarreia inflamatória, caracterizada por eliminação de fezes em pequeno volume, com sangue, muco e pus. Em muitos casos, o quadro é precedido, nas primeiras 12-18 horas, por diarreia aquosa. O paciente pode apresentar, ainda, febre alta, dores abdominais em cólica, tenesmo, fadiga, anorexia e mialgia generalizada. Pequenas úlceras que, em geral, restringem-se à lâmina própria e acometem apenas o cólon e o reto podem ser observadas. Casos mais graves estão mais comumente associados à infecção por *S. dysenteriae* e *S. flexneri* (Noriega *et al.*, 1995; Houg *et al.*, 1997; Vargas *et al.*, 1999; Ina *et al.*, 2003; Navia *et al.*, 2004; Niyogi *et al.*, 2004; Thong *et al.*, 2005; Nataro *et al.*, 2007).

Seres humanos e primatas superiores são os únicos reservatórios naturais de *Shigella* (Ina *et al.*, 2003; Nataro *et al.*, 2007). O microrganismo é transmitido, na maioria das vezes, pela via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados. Calcula-se que a dose infectante da bactéria seja de cerca de 100 células, uma das razões pelas quais a shigelose é uma doença altamente contagiosa, podendo ser transmitida pelo contato pessoa-pessoa (Fernandez &

Sansonetti, 2003; Ina *et al.*, 2003; Kingombe *et al.*, 2005).

O número estimado de episódios anuais de shigelose endêmica em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento é de 1,5 e 163,2 milhões, respectivamente. Admite-se que cerca de 1,1 milhões de pessoas com infecção por *Shigella* evoluam para o óbito anualmente, em especial crianças de países em desenvolvimento. Nestes países, o quadro é mais comum em crianças menores de cinco anos, principalmente após o segundo ano de vida e as espécies detectadas mais frequentemente são *S. flexneri* e *S. dysenteriae*. Em países desenvolvidos, a maioria dos casos da doença está associada a *S. sonnei* e *S. flexneri* (Kotloff *et al.*, 1999; Nataro *et al.*, 2007; Nyachuba, 2010).

A shigelose é, geralmente, autolimitada. Foi demonstrado que o uso de antimicrobianos em pacientes com disenteria reduz a duração da doença, a taxa de mortalidade associada à mesma e o período de eliminação do microrganismo. Entretanto, pode contribuir para o desenvolvimento da síndrome hemolítico-urêmica (Lima *et al.*, 1995; Ina *et al.*, 2003; Cheasty *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2005; Christopher *et al.*, 2010).

O diagnóstico laboratorial da shigelose é realizado, tradicionalmente, por pesquisa de leucócitos fecais e coprocultura. A pesquisa de leucócitos nas fezes é um teste pouco sensível e sua presença indica, apenas, diarreia de natureza inflamatória. A coprocultura é considerada método de referência para o diagnóstico da doença. A identificação do microrganismo no nível de espécie é realizada pelo emprego de antissoros específicos. Métodos genéticos, como PCR, cuja utilização ainda restringe-se a laboratórios de pesquisa, possibilitam não apenas a detecção do microrganismo mas também a caracterização dos isolados (Ina *et al.*, 2003; Vu *et al.*, 2004; Nataro *et al.*, 2007; Rúgeles *et al.*, 2010).

ECOLOGIA MICROBIANA INTESTINAL

A microbiota indígena do intestino é composta por uma enorme variedade de microrganismos, na sua imensa maioria, bactérias anaeróbias obrigatórias. Estima-se que entre 500 e 1000 espécies colonizem o intestino humano, totalizando cerca de 10^{13} células bacterianas (Mackie *et al.*, 1999; Xu & Gordon, 2003; Kaper & Sperandio, 2005; Thompson-Chagoyán *et al.*, 2007; Sekirov *et al.*, 2010).

A colonização do indivíduo tem início durante o nascimento, quando o recém nascido entra em contato com microrganismos provenientes da mãe e do ambiente. Diversos fatores como canal do parto, nível de exposição a microrganismos durante o período neonatal e tipo de alimentação influenciam a colonização inicial do tubo digestivo (Mackie *et al.*, 1999). *E. coli* e *Enterococcus faecalis* são as espécies pioneiras, atingindo altos níveis populacionais no intestino delgado cerca de 12 horas após o nascimento. A seguir, observa-se uma sucessão microbiana, durante a qual há um aumento gradual das concentrações de bactérias anaeróbias obrigatórias em detrimento daquelas de bactérias anaeróbias facultativas. Quando a comunidade clímax se estabelece, aproximadamente no segundo ano de vida, o intestino de seres humanos apresenta-se colonizado predominantemente por anaeróbios obrigatórios, que representam cerca de 99% da microbiota (Rambaud, 1992; Wilson, 1995; Mackie *et al.*, 1999; Hao & Lee, 2004; Kaper & Sperandio, 2005; Thompson-Chagoyán *et al.*, 2007).

A diversidade e a concentração de bactérias constituintes da microbiota indígena intestinal variam de acordo com a região, na dependência de diversos fatores, como pH, peristaltismo, potencial de oxirredução, adesão bacteriana, secreção de mucinas, disponibilidade de nutrientes, dieta e antagonismo bacteriano. A partir do esôfago, observa-se, no sentido caudal, um nítido aumento de diversidade e densidade populacional. No intestino grosso, cerca de 10^{11} bactérias/grama de conteúdo, distribuídas no lúmen, na camada de muco que cobre todo o epitélio, na camada profunda de muco das criptas intestinais e na superfície das células epiteliais, constituem a microbiota residente (Savage, 1987; Mackie *et al.*, 1999;

Hao & Lee, 2004; Sekirov *et al.*, 2010).

O intestino representa um ecossistema muito complexo e a microbiota intestinal desempenha papel protetor fundamental, dificultando a colonização por microrganismos diarreioogênicos e limitando a concentração de microrganismos endógenos potencialmente patogênicos que, em condições de equilíbrio, convivem em harmonia com o hospedeiro (Savage, 1987; Rambaud, 1992; Portrait *et al.*, 2000). Diversos mecanismos, como produção de bacteriocinas e outros metabólitos, competição por receptores e nutrientes, estabelecimento de baixo potencial de oxirredução e estímulo ao sistema imunológico do hospedeiro, já foram relatados (Hentges, 1969; Savage, 1987; Toshima *et al.*, 2007).

BACTERIOCINAS

A expressão de antagonismo é um fenômeno amplamente disseminado entre bactérias. A primeira descrição de antagonismo bacteriano data de 1877, quando Pasteur e Joubert observaram que amostras de *E. coli* isoladas de urina apresentavam atividade contra *Bacillus anthracis*. Em 1925, Gratia descreveu a produção de uma substância antibacteriana produzida por *E. coli* ativa contra outra amostra da espécie, sendo a natureza proteica da substância descrita, em 1932, pelo pesquisador. Em 1946, o termo colicina foi proposto por Gratia e Fredericq, para designar proteínas com propriedades antibacterianas produzidas por membros da família Enterobacteriaceae. O termo bacteriocina foi proposto por Jacob e colaboradores, em 1953, após a observação de que bactérias pertencentes a outras famílias também eram capazes de produzir substâncias com atividade antibacteriana (Konisky, 1978; Daw & Falkiner, 1996).

As bacteriocinas são substâncias complexas, com fração proteica biologicamente ativa que pode estar ou não associada a lipídios e/ou carboidratos. São sintetizadas no nível de ribossomos e sua produção já foi descrita para inúmeras espécies bacterianas, tanto Gram negativas como Gram positivas. Exibem ação bactericida, em geral de espectro limitado, sendo ativas principalmente sobre bactérias da mesma espécie ou de espécies taxonomicamente relacionadas (Konisky, 1978; Braun *et al.*, 1994; Jack *et al.*, 1995; Daw & Falkiner, 1996; Smajs

et al., 1997; Lima *et al.*, 2002; Padilla *et al.*, 2006).

Considerando que esta investigação restringe-se a atividade antagonista expressa por amostras de *Shigella*, apenas bacteriocinas produzidas por enterobactérias serão discutidas em maiores detalhes. Tendo em vista facilitar a compreensão do texto, esclarecemos que bacteriocinas sintetizadas por enterobactérias serão discriminadas em colicinas, cuja massa molecular é superior a 20, 25 ou 40kDa, e microcinas, que apresentam massa molecular inferior a 10kDa (Pons *et al.*, 2002; Heng & Jack, 2006; Cascales *et al.*, 2007).

Com exceção da colicina 28b, produzida por *Serratia marcescens*, os determinantes genéticos das colicinas são de natureza plasmidial, o que facilita a transferência horizontal dos mesmos pelos processos clássicos de recombinação. Os plasmídios colicinogênicos podem codificar a síntese de uma única ou mais colicinas (Cascales *et al.*, 2007).

Duas classes de plasmídios colicinogênicos, denominados pCol, podem ser discriminadas. Os plasmídios do tipo I são pequenos, apresentando de 6 a 10Kb, e, habitualmente, cerca de 20 cópias estão presentes por célula. Já os plasmídios do tipo II são conjugativos, possuem cerca de 40Kb e apenas uma cópia por célula é observada (Gillor *et al.*, 2004; Cascales *et al.*, 2007). A estrutura dos *operons* associados à síntese de colicinas é variável. Além do gene que codifica a colicina, podem estar presentes o gene responsável pela imunidade da célula produtora à colicina e o gene que codifica a proteína de lise ou liberadora de colicina (Cascales *et al.*, 2007).

A interação entre colicinas e bactérias suscetíveis ocorre através de ligação da substância antagonista a receptores presentes na membrana externa da célula, translocação através do envelope celular atingindo a membrana citoplasmática ou o citoplasma e, em uma etapa final, alterações metabólicas na célula alvo. As colicinas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com a forma de liberação pela célula produtora e com o sistema utilizado para alcançar o espaço periplasmático e atingir a membrana citoplasmática da célula alvo (Duché *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2007; Cascales *et al.*, 2007; Duché, 2007; Masi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

De uma maneira geral, colicinas do grupo A são codificadas por plasmídios tipo I e secretadas no meio extracelular em decorrência da coexpressão da proteína de lise, razão pela qual são substâncias de biossíntese letal. Utilizam o sistema Tol, constituído pelas proteínas TolA, TolB, TolQ, TolR e PAL, para alcançarem seu alvo. Colicinas do grupo B, quase sempre codificadas por genes localizados em plasmídios tipo II, não são liberadas, permanecendo acumuladas no citoplasma das células produtoras, que permanecem viáveis. São translocadas via sistema Ton B, composto pelas proteínas Ton B, ExbB e ExbD (Smajs & Weinstock, 2001b; Duché *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2007; Cascales *et al.*, 2007; Duché, 2007; Masi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

As alterações metabólicas induzidas pelas colicinas incluem formação de poros na membrana citoplasmática levando à redução do potencial eletroquímico da membrana (colicinas A, B, E1, Ia, Ib, K, N, U, S4, 5 e 10), inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular (colicina M), inibição da síntese proteica pela clivagem do RNA ribossômico 16S (colicinas D, E3, E4, E5, E5) ou degradação do DNA cromossômico (colicinas E2, E7, E8, E9) (Cascales *et al.*, 2007).

Como já mencionado, as bactérias produtoras possuem um mecanismo de proteção contra suas próprias colicinas. Esta autoproteção está relacionada à síntese de uma proteína de imunidade, expressa constitutivamente, que não impede a ligação da colicina a receptores da membrana externa, mas parece atuar nos estágios subsequentes. No caso das colicinas formadoras de poros, a proteína de imunidade atua impedindo a passagem da colicina pela membrana citoplasmática e a formação do poro e para colicinas que apresentam atividade enzimática, a inativação deve-se à cobertura física do centro ativo que é o sítio de ligação da proteína de imunidade (Pugsley, 1984; Braun *et al.*, 1994; Wilson, 1995).

Além da imunidade, há dois outros mecanismos de resistência a colicinas, perda ou alteração do receptor presente na superfície celular, que pode conferir resistência a todas as bacteriocinas que reconhecem o mesmo receptor, e alterações nas proteínas de membrana envolvidas na translocação da colicina, em decorrência de mutações nos genes que codificam estas proteínas (Riley,

1998).

No que se refere às microcinas, duas classes podem ser diferenciadas, classe I, composta por substâncias de massa molecular inferior a 5,0kDa, que sofrem modificações pós traducionais e classe II, que inclui bacteriocinas com massa molecular mais elevada. Esta classe é subdividida em IIa, constituída por substâncias que podem apresentar pontes dissulfeto e não sofrem modificações pós-traducionais, e IIb, que engloba microcinas lineares que podem sofrer pequenas modificações na extremidade carboxila (Duquesne *et al.*, 2007).

Diferente das colicinas, as microcinas são comumente codificadas por genes plasmidiais e cromossômicos, sua síntese não é induzida pelo sistema SOS e não é letal para a célula produtora. Microcinas são sintetizadas quase exclusivamente por amostras de *E. coli*. Apenas 14 microcinas foram identificadas até o momento e, ao contrário das colicinas, poucas estão bem caracterizadas quanto a estrutura e mecanismo de ação (Baquero & Moreno, 1984; Kolter & Moreno 1992; Heng & Jack 2006; Pons *et al.*, 2002; Cascales *et al.*, 2007; Duquesne *et al.*, 2007).

As relações entre as bactérias decorrentes da ação de bacteriocinas podem ser de autoantagonismo, isoantagonismo e heteroantagonismo. Apesar destes três tipos de antagonismo já terem sido observados para bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas, o isoantagonismo, ou seja, antagonismo entre amostras da mesma espécie, é a relação mais comumente relatada para este grupo de bactérias. O heteroantagonismo é uma relação de antagonismo entre espécies diferentes, inclusive entre bactérias Gram negativas e Gram positivas, e o autoantagonismo ocorre quando uma determinada bacteriocina é capaz de agir contra a amostra produtora. O autoantagonismo já foi descrito tanto para bactérias Gram negativas (Farias *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1998) como para Gram positivas (Konisky, 1978; Jack *et al.*, 1995), mas sua ocorrência é mais comum entre as últimas (Jack *et al.*, 1995). Este tipo de relação não é observado em enterobactérias devido à expressão de imunidade pelas amostras produtoras de colicinas (Cascales *et al.*, 2007).

Vários fatores relacionados às condições de cultivo podem influenciar a produção

de bacteriocinas, como o pH e a composição do meio de cultivo, as condições de incubação e a fase de crescimento do microrganismo. Portanto, a metodologia para estudo da produção de bacteriocinas deve ser cuidadosamente padronizada (Aasen *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002; Verluyten *et al.*, 2004).

A produção de bacteriocinas tem sido descrita para diversos membros da família Enterobacteriaceae. A síntese de cerca de 30 colicinas já foi descrita para *E. coli* (Smarda & Smajs, 1998; Cascales *et al.*, 2007). Considerando o gênero *Shigella*, existem relatos de produção de bacteriocinas pelas espécies *S. sonnei*, *S. flexneri* e *S. boydii* (Amako *et al.*, 1978; Dhillon *et al.*, 1982; Smarda *et al.*, 1987; Horák, 1994; Smajs *et al.*, 1997; Tigyi *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2006). Entretanto, estudos que objetivam a caracterização mais detalhada destas substâncias são escassos. A colicina U, produzida por *S. boydii*, é uma colicina formadora de poros na membrana citoplasmática das células suscetíveis, que apresenta um domínio N-terminal, responsável pela translocação através da membrana externa, um domínio central, envolvido na ligação ao receptor, e um domínio C-terminal, responsável pela formação dos poros na membrana citoplasmática (Smajs *et al.*, 1997; PilsI *et al.*, 1998). Entre as colicinas produzidas por *S. sonnei*, a colicina Js é a mais bem estudada e a mais frequentemente encontrada em *screenings* epidemiológicos. É ativa contra amostras de *S. sonnei*, *S. boydii* e *E. coli* enteroinvasiva, mas não exibe atividade contra *E. coli* não diarreiogênica (Smarda *et al.*, 1987; Smajs & Weinstock, 2001a; Tigyi *et al.*, 2005).

Apesar da grande importância ecológica das bacteriocinas demonstrada para regiões que não o trato intestinal, resultados de vários estudos a respeito da interação entre enteropatógenos produtores de colicinas e membros da microbiota intestinal são, ainda, inconclusivos. Tem sido sugerido que as condições de microaerofilia e anaerobiose do intestino podem interferir na produção de colicinas e que as mesmas podem sofrer degradação por proteases antes de exercerem seus efeitos sobre as células suscetíveis. Entretanto, nas fezes, as colicinas produzidas por enteropatógenos podem conferir vantagem seletiva, o que é de grande importância na transmissão de microrganismos pela rota fecal-oral (Pugsley, 1984).

Além da possível relevância nas relações envolvendo microrganismos diarreio gênicos, especificamente em relação a *Shigella*, as colicinas apresentam importância prática. O sorogrupo D de *Shigella* é constituído apenas pela espécie *S. sonnei* e, ao contrário das outras espécies do microrganismo, um único sorotipo é reconhecido. A bacteriocinotipagem é uma alternativa útil na diferenciação entre amostras de *S. sonnei*, principalmente aquelas envolvidas em surtos de shigellose, uma vez que os métodos de sorotipagem não podem ser utilizados (Abbott & Shannon, 1958; Gillies, 1964; Chan-Teoh *et al.*, 1971; Reller, 1971; Morris & Wells, 1974; Farkas-Himsley & Pagel, 1977; Castillo *et al.*, 1991, Merino *et al.*, 2000). A diferenciação entre amostras por meio da avaliação da produção de bacteriocinas ou da suscetibilidade a estas substâncias também pode ser utilizada na investigação de surtos causados por vários outros microrganismos, inclusive outras espécies de *Shigella* (McGeachie & McCormick, 1967).

De forma mais abrangente, as bacteriocinas apresentam, ainda, uma ampla gama de possibilidades de aplicação. Um grande incremento nesta área de pesquisa tem sido observado em decorrência das possibilidades de aplicação das bacteriocinas em áreas tais como indústria alimentícia, agropecuária, remediação de ambientes e saúde humana, especialmente como alternativa aos antimicrobianos convencionais (Gillor *et al.*, 2004).

JUSTIFICATIVA

Como mencionado, as bacteriocinas têm sido objeto de numerosos estudos, tanto de natureza básica, que envolvem a caracterização da substância, como de cunho aplicado, que avaliam a possibilidade de emprego das mesmas no controle de populações bacterianas, por exemplo, na conservação de alimentos ou na prevenção de doenças bacterianas e no tratamento de indivíduos infectados, como uma alternativa aos antibióticos clássicos tradicionalmente empregados.

A enterite infecciosa aguda é um quadro, a princípio, de natureza exógena. Bacteriocinas produzidas por microrganismos diarreiogênicos que apresentem atividade contra bactérias da microbiota indígena intestinal podem atuar como fatores de virulência, conferindo vantagem aos mesmos na competição com membros desta microbiota, contribuindo, em última análise, para a sua instalação, possibilitando a expressão das demais habilidades de virulência do organismo.

A relevância da enterite infecciosa aguda, a importância de microrganismos do gênero *Shigella* como agentes da doença, em decorrência da prevalência elevada e da gravidade do quadro associado, e a escassez de relatos referentes à bacteriocinas produzidas pelo microrganismo justificam o desenvolvimento deste estudo, que visa contribuir para o conhecimento básico referente a substâncias antagonistas, para esclarecimento de relações antagonistas entre *Shigella* e outros organismos diarreiogênicos e membros da microbiota intestinal indígena e para o esclarecimento do papel de bacteriocinas na colonização intestinal pela bactéria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- ▶ Avaliar a produção de bacteriocina(s) por amostras de *Shigella* isoladas de crianças com diarreia aguda e caracterizar a substância antagonista produzida por uma das amostras de *S. sonnei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Pesquisar a produção de bacteriocina por amostras de *S. sonnei* e *S. flexneri* isoladas de crianças com diarreia aguda.
- ▶ Avaliar a influência de condições de cultivo (composição e pH do meio de cultivo, atmosfera e temperatura de incubação e fase de crescimento) na expressão de antagonismo por amostras de *S. sonnei*.
- ▶ Avaliar a heterogeneidade populacional de amostras de *S. sonnei* produtoras de bacteriocina em relação à característica “expressão de antagonismo”.
- ▶ Extrair, purificar e caracterizar parcialmente uma bacteriocina produzida por uma amostra de *S. sonnei*.
- ▶ Avaliar a presença de determinantes genéticos que codificam a síntese de colicinas e microcinas nas amostras de *S. sonnei* e *S. flexneri*.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 2

ARTIGO 3

Phenotypic and genotyping of bacteriocinogeny in *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* strains

Sousa MAB¹, Farias LM¹, Nascimento AMA², Oliveira PL¹, Mendes EN³, Magalhães P.P.^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

³Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Running title: Phenotypic and genotyping detection of *Shigella* bacteriocinogeny

*Corresponding author: Paula Prazeres Magalhães, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. Phone: + 55 31 34099775, Fax: + 55 31 34099782, e-mail: ppmagalhaes@ufmg.br

ABSTRACT

Bacteriocins are commonly expressed antibacterial proteins that markedly influence bacterial relationships. Bacteriocins synthesized by enterobacteria are discriminated in colicins or microcins on the basis of their molecular mass and other characteristics. The genetic determinants of several colicins and microcins have already been determined. Almost all known colicins and some microcins are plasmid encoded. We addressed by employing phenotypic and genotypic methods bacteriocinogeny in *S. sonnei* and *S. flexneri* strains. Almost 40% of bacterial isolates expressed antagonism against *Escherichia coli* K12 Row and also *E. coli* transformant strains carrying different colicin and microcin plasmids. All *Shigella* isolates harbor at least one bacteriocin determinant. Multiple bacteriocin determinants were found in the vast majority of bacterial strains and a great diversity of combinations was detected. Data generated by this investigation confirms that bacteriocinogeny is a widespread ability among *S. sonnei* and *S. flexneri* isolates and argues in favor of a key role for the phenomenon in mediating dynamics of bacterial population.

Keywords: *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, bacteriocin, colicin, colicinogeny.

INTRODUCTION

Bacteriocins are highly diverse antimicrobial proteins that seem to play a key role in mediating bacterial dynamics. The expression of bacteriocins is considered to be a widespread ability described for all major lineages of bacteria. These antagonistic substances are ribosomally synthesized and generally have a narrow phylogenetic target range (Riley & Wertz, 2002). Besides the relevance of bacteriocins in naturally occurring microbial communities their potential applications in the livestock industry, as food preservatives, for environment remediation, and in human health mainly as an alternative to broad-spectrum conventional antibiotics greatly incremented this research field (Gillor *et al.*, 2004).

Bacteriocins produced by and active against *Escherichia coli* and related bacteria such as *Shigella* are classified as colicins and microcins. Colicins are high molecular mass proteins almost exclusively encoded by plasmidial genes that may be associated or not in clusters consisting of the colicin gene, an immunity gene that confers to the producer cell immunity to its own colicin, and a lysis gene associated with colicin release. Colicin synthesis is mediated by the SOS regulon and consequently produced mainly under stress conditions (Riley & Wertz, 2002; Cascales *et al.*, 2007).

Colicins are the most studied group of bacteriocins and over thirty colicin types have already been described to date (Gillor *et al.*, 2009). The best characterized colicins originally produced by *Shigella* are colicin U expressed by *S. boydii* and colicin Js synthesized by *S. sonnei* (Smarđa *et al.*, 1987; Horák; 1990, Smajs *et al.* 1997).

Microcins are antimicrobial proteins sized less than 10KDa discriminated as class I and class II microcins on the basis of their molecular mass and other characteristics such as the occurrence of post-translational modifications (Pons *et al.*, 2002; Cascales *et al.*, 2007). Differently from colicins, microcins are commonly encoded by plasmidial and chromosomal determinants, their secretion is an active process which is not lethal to the producer cell, and their synthesis is not induced by the SOS response (Gillor *et al.*, 2004; Jeziorowski & Gordon, 2007). Fourteen microcins have already been identified and little is known about the structure and mode of action to these antagonistic substances. Among them only seven have been isolated and characterized (Duquesne *et al.*, 2007).

We have previously investigated antagonism expression by *Shigella sonnei* (Sousa *et al.*, 2010) and *Shigella flexneri* strains against a large series of members of the intestinal indigenous microbiota and diarrheagenic bacteria. The purpose of this study was to evaluate by employing phenotypic and genotypic methods bacteriocinogeny in *S. sonnei* and *S. flexneri* strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

A total of 16 *S. sonnei* (SS1 to SS16) and 10 *S. flexneri* strains (SF1 to SF10) isolated from faecal specimens of children with acute diarrhea who searched for assistance at Hospital Infantil

João Paulo II/FHEMIG, Belo Horizonte, Brazil, and also *S. flexneri* ATCC 12022 were screened for antagonistic activity (test strains). *E. coli* K12 Row (plasmid free) and transformant strain carrying the plasmids pColA, pColB, pColD, pColE1, pColE2, pColE3, pColE4, pColE5, pColE6, pColE7, pColE8, pColE9, pColla, pCollb, pColJs, pColL, pColM, pColN, pColS4, pColU, pColY, pCol10, pmicH47, pmicJ25, pmicL, pmicV, pmicM, and pmicB17 were employed as indicators to evaluate antagonistic activity.

Bacterial strains were stored at -80°C in Brucella Broth (Difco, Sparks, MD, USA) added with 10% glycerol (v/v). *Shigella* isolates were subcultured three times before being tested for antagonism expression.

Phenotypic screening for bacteriocinogeny

Antagonistic activity assays were conducted by using the overlay method (Booth *et al.*, 1977). Cultures were performed in Tryptic Soy Broth (TSB; Difco) or Tryptic Soy Agar (TSA; Difco), pH 7.0 at 37°C for 24 h under aerobic atmosphere unless otherwise stated. Liquid cultures of test strains were inoculated with a Steers' replicator onto agar medium and after incubation they were killed by exposure to chloroform vapor for 30 min. Residual chloroform was allowed to evaporate and the cultures were overlaid with 3.5 ml of semi-solid (0.7% agar w/v) TSA that had been inoculated with 10 µl of a broth culture of each indicator strain. After incubation the presence of growth inhibition zones was evaluated.

Genotypic screening for bacteriocinogeny

Test strains were cultivated overnight on TSA plates at 37°C. After that bacterium cells were suspended in 500 µL sterile Milli-Q[®] water (Millipore, Molsheim, France) and pelleted for 15 min at 6,000 g. DNA was isolated by a phenol-chloroform method proposed by Fox *et al.* (1994). DNA concentration was estimated in a NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA) and adjusted to 20 ng/µL. PCR mix contained 1 µL template, 0.2mM each dNTP (Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontario, Canada), and 1U *Taq* DNA polymerase (Phonutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Primer and MgCl₂ concentrations employed for detecting each target gene are depicted in Table 1. PCR amplification conditions were as follow: an initial cycle at 94°C for 4 min, 30 (for colL, micL, and micJ25) or 40 cycles (for all other bacteriocin determinants) of 94°C for 30 s, annealing temperature for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final cycle at 72°C for 5 min. Annealing temperatures differed among amplification reactions as discriminated in Table 1. Reactions mixtures were cycled in an MJ Research thermocycler (Watertown, MA, USA).

Amplified PCR products were resolved in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized using an ultraviolet transilluminator MultiDoc-It Imaging System (UVP, Upland, California, USA). GeneRuler[™] 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences) was employed as molecular size marker. Positive (*E. coli* transformant strains carrying each of the investigated

determinants) and negative controls (*E. coli* K12 Row and *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472) and negative internal control (sterile Milli-Q[®] water) were included in each batch of reaction.

RESULTS

Antagonism expression was detected by phenotypic tests in 10 (37.0%) *Shigella* strains, nine (56.3%) *Shigella sonnei* and one (9.1%) *Shigella flexneri*. Phenotypic tests demonstrated the occurrence of six (60.0%) different susceptible indicator strain profiles (Table 2).

Results regarding genotypic assays demonstrated that all *Shigella* strains carry at least one colicin determinant. Among the 22 colicin genes surveyed, 10 were detected in *Shigella sonnei* (colB, colD, colE1, colE2, colE3, colE4, colE7, colE8, colE9, colN) and six in *S. flexneri* (colD, colE1, colE2, colE3, colE4, colE7) (Table 2).

With regard to microcins positive results were found in 10 (62.25%) *S. sonnei* and three (27.3%) *S. flexneri* strains. Only two out of the six microcin determinants evaluated were observed in *Shigella* isolates, micH47 and micV in *Shigella sonnei* and micV in *Shigella flexneri* (Table 2).

The great majority of strains (25/27, 92.6%) carried multiple colicin genes. All *S. sonnei* isolates carried at least three colicin determinants. Up to 10 bacteriocin markers were found in the same bacterial strain. Twenty two (81.5%) different combinations of bacteriocinogenic genes were observed (Table 2).

Table 3 depicts the frequencies of each bacteriocin determinant. pColE4 was universally present in *Shigella* strains. pColE3 and pColE7 were also observed in the majority of bacterial isolates. ColA, colE5, colE6, colla, collb, colJs, colL, colM, colS4, colU, colY, col10, micJ25, micL, micM, and micB17 were not detected in any isolate.

DISCUSSION

Since their first description around eighty five years ago (Gratia, 1925), bacteriocins have been the subject of plenty of studies. These unique antagonistic substances exhibit a great potential for different practical applications for example for treating patients with infectious disease and as food preservatives (Smarda & Smajs, 1998; Murinda *et al.*, 2002; Trautner *et al.*, 2005; Gillor *et al.*, 2007; Abriouel *et al.* 2010).

Colicins specially those produced by *E. coli* are the best characterized bacteriocins. The high frequency of colicin production in natural populations suggests that colicins play a key role in bacterial relationships (Riley & Gordon, 1996). Although there are theoretical and experimental convincing evidences of the relevance of these antagonistic substances at the level of intraspecific competition the question remains somehow controversial (Gordon, 1998). The fact that the majority of *E. coli* isolates is resistant to most colicins (Riley & Gordon, 1992) argue against a role for these antibacterial substances in intraspecific competition (Gordon, 1998). Whether or not they do act at intraspecific level the precise interactions mediated by bacteriocins remain unknown (Riley, 1998).

In this investigation we evaluated bacteriocinogeny in *S. sonnei* and *S. flexneri* strains

isolated from diarrheal children. Bacterial strains have already been tested for antagonism expression against other diarrheagenic bacteria and also against members of the intestinal indigenous dominant microbiota (Sousa *et al.*, 2010). In the present study *E. coli* K12 Row and *E. coli* transformant strain carrying different bacteriocin determinants evaluated by PCR were used as indicators for antagonistic assays so it would be possible to compare phenotypic and genotypic data.

Reports on the evaluation of bacteriocinogeny among *Shigella* strains are very scarce. Klaenhammer (1988) suggested that all bacteria are able to produce at least one bacteriocin type. According to Reeves (1972) colicinogeny is a frequently observed phenomenon in *S. sonnei* being detected in 50 to 100% of bacterium populations. In regard to *S. flexneri* the proportion of colicinogeny ranges from 3% to 30%. The frequency of colicinogeny varies among different populations of the same species and in different bacterial species, but the reasons for this variation are unknown (Riley & Gordon, 1996).

In this study antagonism expression against *E. coli* was observed for the same 10 *Shigella* strains that have previously exhibited antagonistic activity against *S. flexneri* and enterohemorrhagic, enteroinvasive, and enteropathogenic *E. coli* isolates (Sousa *et al.*, 2010). As it should be expected all bacteriocinogenic strains were able to inhibit *E. coli* K12 Row, considered as a universal indicator strain susceptible to all colicins but colicin Js (Smarda *et al.*, 1987).

On the other hand, bacteriocin determinants were detected in all *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* isolates. It is plausible to hypothesize that experimental conditions employed in the study were not adequate for the expression of all bacteriocins tested. Alternatively it is possible that bacterial isolates were immune to colicins they did not synthesize due to the production of a second immunity protein (Cooper & James, 1984; Lau *et al.*, 1984). Another hypothesis is that *E. coli* indicator strains could be resistant to bacteriocins produced by *Shigella* due to a resistance mechanism, by alteration of a cell surface receptor that binds the substance or due to tolerance, by changes in cell membrane proteins involved in colicin translocation (Riley, 1998).

Among *Shigella sonnei* strains, it seems that colicin Js is the most frequently found in epidemiological screenings (Smarda *et al.*, 1987). The colicin expresses antagonist activity against *S. sonnei*, *S. boydii* and enteroinvasive *E. coli* strains (Smajs & Weinstock, 2001; Tigyi *et al.*, 2005). In the present investigation colicin Js determinant was not found neither were colicin Ib and U plasmids, also described in *S. sonnei* and *S. boydii* (Smajs *et al.*, 1997; Smarda & Smajs, 1998). The colicin E2 determinant originally described in *S. sonnei* (Smarda & Smajs, 1998) was detected in 37.5% of *S. sonnei* strains and in 9.1% of *S. flexneri* isolates.

Small plasmids coding for group A colicins were the most frequently detected in *S. sonnei* and *S. flexneri* isolates. pColE7 and pColE4 that encodes the nuclease colicins E7 and E4 were commonly observed in both studied species. High frequency of nuclease colicins has already been reported for *E. coli* strains (Gordon *et al.*, 1998).

A high frequency of strains carrying multiple colicin determinants was detected in this investigation. These results are in agreement with data previously reported for *E. coli* (Schamberger & Diez-Gonzales, 2004; Gordon & O'Brien, 2006). However, according to Cascales *et al.* (2007)

colicinogenic *E. coli* strains harbor only one specific colicinogenic plasmid.

It has been suggested that the production of several colicins by the same bacteria confers a selective advantage to the producer strain. Bacteria that produce multiple colicins would be able to kill sensitive cells, which do not produce or produce only certain types of colicin. The expression of several colicins is also advantageous because of the ability to bind to different receptors, considering that the resistance by alteration of specific receptors is frequent and it could easily prevent bacteriocin activity in the case that only one bacteriocin type is expressed (Gordon & O'Brien, 2006).

In brief antagonism activity against *E. coli* K12 Row and transformant strains was detected in 37.0% of *Shigella* isolates being almost exclusively detected among *S. sonnei* strains. Genotypic assays demonstrated that all bacterial isolates carry at least one bacteriocin determinant. Colicin plasmids were more frequently observed and the great majority of the strains showed the ability to code for several bacteriocins. A great diversity of bacteriocin determinants combinations was detected. Data generated by the study corroborates that bacteriocinogeny is a widespread ability and argues in favor of a relevant ecological role for the phenomenon.

REFERENCES

- Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, in press.
- Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubès R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71: 158-229, 2007.
- Cooper PC, James R. Two new E colicins, E8 and E9, produced by a strain of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 130: 209-215, 1984.
- Duquesne S, Garzón D, Pedduzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*, 24: 708-7034, 2007.
- Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Shames B, Murphy JC. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J Clin Microbiol*, 32: 1229-1237, 1994.
- Gillor O, Ghazarvan L. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2(2): 115-122, 2007.
- Gillor O, Giladi I, Riley MA. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiology*, 9: 165, 2009.

Gillor O, Kirkup BC, Riley MA. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv Appl Microbiol*, 54: 129-146, 2004.

Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin in *Escherichia coli*. *Microbiol*, 152: 3239-3244, 2007.

Gordon DM, Riley MA, Pinou T. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiol*, 144: 2233-2249, 1998.

Gratia A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C R Soc Biol*, 93: 1040-1041, 1925.

Horak V. Two colicins from *Shigellae*. *Fol Microbiol*, 35: 469-470, 1990.

Jezirowski A, Gordon DM. Evolution of microcin V and Colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 189: 7045-7052, 2007.

Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349, 1988.

Lau PC, Rowsome RW, Watson RJ, Visentin LP. The immunity genes of colicins E2 and E8 are closely related. *Biosci rep*, 4: 565-572, 1984.

Murinda SE, Roberts RF, Wilson RA. Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 62: 3196-3202, 1996.

Pons AM, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, 84: 531-537, 2002.

Reeves P. The bacteriocins. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1972. 142p.

Riley MA. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu Rev Genes*, 32: 255-278, 1998.

Riley MA, Gordon DM. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *J Gen Microbiol*, 138: 1345-1352, 1992.

Riley MA, Gordon DM. The ecology and evolution of bacteriocins. *J Ind Microbiol*, 17: 151-158, 1996.

Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*, 56: 117-137, 2002.

- Schamberger GP, Diez-Gonzales F. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Food Prot*, 67(3): 486-492, 2004.
- Smajs D, Pils H, Braun V. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J Bacteriol*, 179: 4919-4928, 1997.
- Smajs D, Weinstock GM. Genetic organization of plasmids ColJs, encoding colicin Js activity, immunity, and release genes. *J Bacteriol*, 183: 3949-3957, 2001.
- Smarda J, Petzelova J, Vyskot B. Colicin Js of *Shigella sonnei*: Classification of type colicin "7". *Zbl Bakt Hyg*, 263: 530-540, 1987.
- Smarda J, Smajs D. Colicins: exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Fol Microbiol*, 43: 563-582, 1998.
- Sousa MAB, Mendes EN, Apolônio ACM, Farias LM, Magalhães PP. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhea. *APMIS*, 118: 125-135, 2010.
- Tigyi Z, Kispal G, Pal T. Identification of the plasmid and the structural gene of colicin type 7 of *Shigella sonnei*. *Acta Biol Hung*, 56: 359-373, 2005.
- Trautner BW, Hull RA, Arouiche ROD. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J Antimicrob Chemother*, 56: 413-415, 2005.

Table 1. PCR conditions employed for detecting bacteriocin determinants in *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* strains.

Colicin/microcin	Primer sequence (5' – 3')	Primer (μ M)	MgCl ₂ (mM)	Annealing temperature	Amplicon (bp)
colA	F: CGTGGGGAAAAGTCATCATC R: GCTTTGCTCTTTCCTGATGC	0,2	1,0	56°C	475
colB	F: AAGAAAATGACGAGAAGACG R: GAAAGACCAAAGGCTATAAGG	0,2	1,5	56°C	492
colD	F: CTGGACTGCTGCTGGTGATA R: GAAGTGCGCCTACTACTGC	0,3	1,0	56°C	420
colE1	F: TGTGGCATCGGCCGAGAATA R: CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT	0,2	1,5	56°C	649
colE2	F: TGATGCTGCTGCAAAAGAG R: TTCAAAGCGTTCCTACCAC	0,5	1,5	56°C	409
colE3	F: TAAGCAGGCTGCATTTGATG R: TGCGATCTGGACCTTTCAAC	0,2	1,0	56°C	413
colE4	F: GAAGGCTGCATTTGATGCT R: CGGATCCGGACCTTTAATTT	0,2	1,0	56°C	409
colE5	F: TAAGCAGGCTGCATTTGATG R: TTGAATTCTCGAATCGTCCA	0,2	1,5	56°C	430
colE6	F: ACCGAACGTCCAGGTGTT R: TTTAGCCTGTGCTCCTGAT	0,5	1,5	56°C	399
colE7	F: GCATTCTGCCATCTGAAAT R: CTTCTGCCCACTTTCTTTTCG	0,2	1,5	56°C	431

colE8	F: TAAGCAGGCTGCATTTGATG R: GACTGATTGGCTTGTCTGTA	0,2	1,0	62°C	449
colE9	F: TAAGCAGGCTGCATTTGATG R: GACTTTTCTCCCTCCGACCT	2,5	1,5	50°C	418
colla	F: GCATGCAAATGACGCTCTTA R: GAGGACGCCAGTTCTCTGTC	0,5	1,5	56°C	473
collb	F: AACGAGTGGGTCGATGATTC R: CCTTTTCTGCGCTCGTATTC	0,2	1,5	56°C	464
colJs	F: TCAAAATGTTTGGGCTCCTC R: TAATCTGCCCTGTCCCACTG	0,5	1,5	56°C	254
colL	F: TGCATATTGAAAGCGTCAGC R: CAGGTTATCCCCTCTCACCA	0,5	1,0	58°C	
colM	F: GCTTACCACTTCGCAAAACC R: GAGCGACTCTCCGATAATGC	0,2	1,5	56°C	429
colN	F: AGCTTGGCGAGTATCTTGGA R: CAACACAGCCCCGAATAAAC	0,2	1,0	61°C	401
colS4	F: TATATGGCCCAACTGCTGGT R: CGTAAGGACGGACACCTGTT	0,5	1,5	56°C	456
colU	F: TGATTGCTGCGAGAAAAATG R: TCTGACAGCCTCTCCCTGTT	0,5	1,5	56°C	485
colY	F: GCAGGCAGAAAAGAACAAGG R: CGGACGTTATTTGCCTTCAT	0,2	1,5	56°C	477
col10	F: GGTTACCGGATTTCTGGAT	0,5	1,5	56°C	448

	R: TTCTAGATGCTTGGCCCACT				
micH47	F: CACTTTCATCCCTTCGGATTG	0,5	1,5	56°C	227
	R: AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC				
micJ25	F: TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAAT	0,5	1,0	58°C	175
	R: TGATTAAGCATTTCATTTAATAAAGTGT				
micL	F: GGTAATGATATATGAGAGAAATAACGTTA	0,5	1,0	58°C	233
	R: TTTCGCTGAGTTGGAATTCCTGCTGCATC				
micV	F: CACACACAAAACGGGAGCTGTT	0,2	1,0	56°C	680
	R: CTTCCCGCAGCATAGTTCAT				
micM	F: CGTTTATTATTTTATGAATA	2,5	1,5	56°C	456
	R: AAACGGAAGAATGGATGATCTCGCAA				
micB17	F: TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGGCATT	0,5	1,5	56°C	135
	R: TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCACTAC				

Table 2. Bacteriocinogeny in *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* strains.

Shigella strain	Bacteriocinogeny	
	Phenotypic detection (overlay method)	Genotypic detection of colicin and microcin determinants (PCR)
SS1	+: K12 Row, colB, colE2, colE5, colE6, colE7, collb, colJs, colM, colN, micB17, micV ¹	colD, colE1, colE2, colE3, colE4, colE7, colE9, colN, micH47, micV
SS2	+: K12 Row, colB, colE2, colE5, colE6, colE7, collb, colJs, colM, colN, colS4, micB17, micV	colE1, colE3, colE4, colE7, colE9, micH47, micV
SS3	+: K12 Row, colB, colE2, colE5, colE6, colE7, collb, colJs, colM, colN, micB17, micV ¹	colE1, colE2, colE4, colE7, colE9, micV
SS4	-	colE1, colE3, colE4, colE7
SS5	-	colE1, colE3, colE4, colE7, micH47, micV
SS6	+: K12 Row, colB, colE2, colE5, colE6, colE7, collb, colJs, colM, colN, colS4, micB17, micV, micL	colE1, colE3, colE4, colE9, micH47, micV
SS7	-	colE3, colE4, colE7, colE9, micH47
SS8	+: K12 Row, colB, colE5, colE6, colE7, collb, colJs, colM, colN, colS4, micB17, micV, micL	colB, colE2, colE3, colE4, colE7, colE8, colE9
SS9	+: K12 Row, colB, colE5, colE6, colE7, collb, colJs, colM, colN, colS4, micB17, micV, micL	colE1, colE2, colE3, colE4, colE7, colE8, colE9
SS10	+: K12 Row, colB, colE2, colE5, colE6, colE7, collb, colJs, colM, colN, colS4, micB17, micV	colE1, colE4, colE7, micV
SS11	-	colE1, colE3, colE4, colE7, colE9, micV
SS12	-	colE2, colE4, colE7, colE9

SS13	+: K12 Row, colB, colE5, colE6, colE7, colIb, colJs, colM, colN, colS4, micJ25, micB17, micV, micL	colE1, colE2, colE3, colE4, colE7, colE8, colE9
SS14	-	colE4, colE7, colE9
SS15	-	colE3, colE4, colE7, colE9, micV
SS16	+: K12 Row, colB, colE2, colE5, colE6, colE7, colIb, colJs, colM, colN, colS4, micB17, micV	colE1, colE4, colE7, micV
SF1	-	colE4
SF2	-	colE1, colE4, colE7, micV
SF3, SF10	-	colE3, colE4
SF4, SF6	-	colE4, colE7
SF5	-	colE4, colE7, micV
SF7	-	colE3, colE4, colE7
SF8	-	colE4
SF9	-	colD, colE3, colE4, micV
SF11	+: K12 Row, colA, colB, colE2, colE5, colE6, colE7, colIb, colJs, colM, colN, micB17, micV	colD, colE1, colE2, colE3, colE4, colE7

¹ Susceptible *E. coli* indicator strains among *E. coli* K12 Row (without plasmid) and transformant strains carrying specific colicin and microcins determinants.

Table 3: Frequency of colicin and microcin determinants in *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* strains

Colicin/microcin ¹	<i>S. sonnei</i> (n = 16)	<i>S. flexneri</i> (n = 11)	Total
colE4	100 ²	100	100
colE7	93.8	54.6	77.8
colE9	75.0	0.0	44.4
colE3	68.8	45.5	59.3
colE1	68.8	18.2	48.1
colE2	37.5	9.1	25.9
colE8	18.8	0.0	11.1
colD	6.3	18.2	11.1
colB	6.3	0.0	3.7
colN	6.3	0.0	3.7
micV	56.3	27.3	44.4
micH47	31.3	0.0	18.5

¹, colA, colE5, colE6, colla, collb, colJs, colL, colM, colS4, colU, colY, col10, micJ25, micL, micM, and micB17 determinants were not detected; ², %.

DISCUSSÃO

A diarreia infecciosa aguda é um importante problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. Atinge todas as camadas sociais e faixas etárias da população e é responsável por altos índices de morbimortalidade, principalmente na infância. Entre os agentes bacterianos diarreio gênicos, *Shigella* destaca-se pela prevalência e pela gravidade do quadro clínico associado (Niyogi, 2005; Boschi-Pinto *et al.*, 2008; Navaneethan & Gianella, 2008). Em estudo desenvolvido pelo nosso grupo, amostras de *Shigella* foram isoladas de espécimes fecais de mais de 10% das crianças com diarreia aguda, com grande predomínio de *S. sonnei* (Sousa, 2005).

Bacteriocinas são substâncias sintetizadas por bactérias que apresentam fração proteica biologicamente ativa e exibem atividade antibacteriana especialmente contra amostras taxonomicamente relacionadas. Parecem influenciar nas relações ecológicas entre populações bacterianas, podendo, inclusive, desempenhar papel na virulência do organismo produtor da substância (Reeves, 1972; Riley & Gordon *et al.*, 1999; Riley & Wertz, 2002).

A produção de bacteriocinas tem sido descrita para diversos membros da família Enterobacteriaceae. A primeira bacteriocina descrita, produzida por uma amostra de *E. coli*, foi denominada colicina, termo que pode ser empregado também para designar bacteriocinas produzidas por outras enterobactérias, como *Shigella*. As enterobactérias, quase exclusivamente *E. coli*, podem sintetizar, ainda, outra categoria de bacteriocinas, denominadas microcinas. Colicinas e microcinas apresentam inúmeras diferenças, entre elas massa molecular, codificação cromossômica ou plasmidial, associação ou não com sistema SOS, mecanismo de secreção e consequência da síntese para a célula produtora (Pons *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2004; Cascales *et al.*, 2007).

No que se refere a *S. sonnei*, embora a expressão de colicinas já tenha sido observada, poucos estudos incluem a caracterização destas substâncias (Amako *et al.*, 1978; Smarda *et al.*, 1987; Horák, 1994; Tigyi *et al.*, 2005). A maior parte dos relatos envolve tipagem da bactéria com base na produção de colicinas e na sensibilidade às mesmas, que pode ser empregada em estudos epidemiológicos,

inclusive para diferenciar amostras de *S. sonnei* envolvidas em surtos de shigelose (Abbott & Shannon, 1958; Castillo *et al.*, 1991).

Inicialmente, propôs-se testar a expressão de antagonismo por amostras de *S. sonnei* isoladas de espécimes fecais de crianças com diarreia aguda. Os dados gerados pelo *screening* demonstraram que a maior parte (56,3%) das 16 amostras teste de *S. sonnei* foram capazes de inibir uma ou mais amostras reveladoras. Segundo Reeves (1972), 50 a 100% das amostras da bactéria produzem bacteriocinas.

Visando eliminar a possibilidade de antagonismo decorrente da presença de bacteriófagos, ácidos graxos ou outros ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano, peróxido de hidrogênio e clorofórmio, foram realizados testes específicos. Os resultados afastaram esta possibilidade, sugerindo que a síntese de substância(s) antagonista(s) era responsável pela inibição observada.

No que se refere ao tipo de antagonismo expresso, todas as amostras produtoras exibiram isoantagonismo e heteroantagonismo. Autoantagonismo não foi detectado em nenhuma das condições em que os experimentos foram realizados. De fato, embora já tenha sido descrito para bactérias Gram negativas, a expressão deste fenômeno parece não ocorrer em enterobactérias e é mais frequentemente observada para bactérias Gram positivas (Farias *et al.*, 1992; Jack *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 1998, Cascales *et al.*, 2007).

Entre as nove amostras que expressaram isoantagonismo, sete mostraram-se sensíveis à ação de substância(s) produzida(s) por outras amostras, o que sugere a síntese de substâncias antagonistas diferentes pelas mesmas. A observação de diferentes padrões de sensibilidade entre as amostras reveladoras, tanto para isoantagonismo como para heteroantagonismo, reforça esta hipótese. Em 1994, Horák descreveu a capacidade de produção de 16 colicinas diferentes por *S. sonnei*. Considerando a capacidade de produção destas colicinas isoladamente ou em combinações, 70 padrões foram descritos, sendo a produção de mais de uma colicina pela mesma amostra um fenômeno muito frequente. A produção de várias colicinas por uma mesma amostra também é comumente observada em *E.*

coli (Schamberger & Diez-Gonzalez, 2004; Jeziorowski & Gordon, 2007).

Dados da literatura demonstram que as condições de cultivo interferem na expressão de antagonismo (Aasen *et al.*, 2000; Verluyten *et al.*, 2004). Portanto, a otimização destas condições é fundamental para uma avaliação acurada da propriedade. Nesta investigação, diferentes meios de cultura (composição e pH) e condições de incubação (temperatura e atmosfera) foram empregados. Observou-se que a expressão de antagonismo foi influenciada pelas condições de cultivo, tendo sido detectadas diferenças entre os resultados obtidos para isantagonismo e heteroantagonismo.

Se avaliados em conjunto, os resultados relativos a espectro de ação da(s) substância(s) antagonista(s) bem como a condições ambientes mais adequadas para expressão do antagonismo sugerem que a produção de colicinas não confere vantagem competitiva para *S. sonnei* frente a membros da microbiota indígena intestinal. Em nenhuma das condições empregadas observou-se atividade contra os microrganismos anaeróbios obrigatórios membros da microbiota indígena dominante do intestino. Ainda, as condições mais adequadas para expressão da atividade antagonista são diferentes daquelas presentes no intestino.

Existe relato de produção de colicinas por *S. flexneri* ativas contra *E. coli* e *Bacteroides fragilis* isolados da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, indicando que a produção de bacteriocinas pode constituir uma habilidade de virulência para *S. flexneri* (Padilla *et al.*, 2004). Na amostragem incluída no presente estudo, apenas patótipos diarreiogênicos de *E. coli* e *S. flexneri* mostraram-se sensíveis à(s) substância(s) antagonista(s) produzida(s) por *S. sonnei*. Desta forma, é plausível supor que a expressão de antagonismo contribua para a competição entre *S. sonnei* e outras bactérias diarreiogênicas, a princípio, em um momento que antecede a infecção.

A importância ecológica de bacteriocinas no ecossistema intestinal ainda não foi demonstrada de maneira conclusiva. Assim como atividade de *S. flexneri* contra bactérias da microbiota intestinal indígena, inibição de *S. flexneri* por membros

desta microbiota já foi descrita, sugerindo que bacteriocinas possam desempenhar papel protetor da microbiota intestinal contra a instalação de amostras diarreio gênicas (Hentges, 1969). Entretanto, deve-se ressaltar que estes dados são originados de estudo *in vitro*. *In vivo*, diversos fatores físicos, químicos e biológicos, como, por exemplo, proteases, podem interferir de forma relevante na atividade destas substâncias.

Segundo Bures *et al.* (1979), o período de excreção de *Shigella* é significativamente reduzido quando uma amostra de *E. coli* produtora de colicina está presente na microbiota, mas não difere entre pacientes infectados por amostras de *Shigella* produtoras e não produtoras de bacteriocinas. No entanto, há indícios de que bacteriocinas produzidas por enteropatógenos, como *Shigella*, podem ser ecologicamente importantes fora do trato intestinal. Nas fezes, a síntese de bacteriocinas por enteropatógenos contribui para sua proliferação e, conseqüentemente, manutenção de níveis dominantes em relação aos microrganismos competidores, favorecendo sua transmissão (Konisky, 1978; Pugsley, 1984).

Com base nos resultados obtidos, a amostra SS9 foi selecionada para emprego na próxima etapa do estudo. Após extração proteica, três frações apresentaram atividade antagonista. A fração extracelular precipitada com 75% de sulfato de amônio (S-75) foi parcialmente caracterizada. S-75 mostrou-se resistente a valores de pH extremos, mantendo-se estável por até 14 dias em pH 5,0 e 6,0 e após tratamento com ácidos orgânicos. A fração ainda permanece ativa após armazenamento a -80°C por mais de dois anos. A perda de atividade após tratamento com enzimas proteolíticas e a termolabilidade reforçam a hipótese de que a substância antagonista é uma bacteriocina.

O próximo passo foi avaliar a produção de substâncias antagonistas ao longo da curva de crescimento bacteriano. O fenômeno foi detectado a partir do início da fase exponencial de crescimento bacteriano e, embora a maior produção tenha sido observada no início da fase estacionária (80 minutos), como relatado para a microcina B17 (Hernandes-Chico *et al.*, 1986), optou-se por não empregar culturas neste período da curva de crescimento nas próximas etapas da

investigação. Considerando que o rendimento e a concentração de proteína dos extratos obtidos foram satisfatórios quando culturas incubadas por 12 horas e 24 horas (fase estacionária) foram utilizadas e que, operacionalmente, o trabalho seria muito facilitado, decidiu-se utilizar culturas nesta fase de crescimento para extração de proteínas.

Apesar de S-75 obtida a partir da cultura incubada por 24h ter apresentado atividade inibitória adequada, a purificação desta fração não foi bem sucedida. A ação de proteases presentes no meio extracelular pode explicar este resultado.

Empregando-se cultura da amostra SS9 incubada por 12h, detectou-se atividade antagonista maior nas frações intracelulares. Então, optou-se por empregar, a partir deste momento, culturas bacterianas incubadas por 12h e fração proteica intracelular. Extratos intracelulares já foram utilizados com sucesso por outros autores (Miranda *et al.*, 1993; Farias *et al.*, 1994; Apolônio *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008; Ribeiro-Ribas *et al.*, 2009).

Entre as frações intracelulares, aquela precipitada com 75% de sulfato de amônio (C-75) exibiu atividade inibitória contra um número maior de amostras reveladoras em comparação com as demais frações proteicas ativas. Além disso, esta fração foi a que apresentou o maior de título de atividade antagonista, expresso em UA de bacteriocina/mL (Yamamoto *et al.*, 2003). Assim, esta fração foi selecionada para as etapas posteriores do estudo.

C-75 manteve-se ativa após tratamento por 24h com tampões cujos valores de pH variaram de 1,0 a 11,0. Em valores de pH 5,0; 6,0 e 7,0, a atividade inibitória de C-75 foi mantida por um período de tempo maior. A proteína foi totalmente inativada por enzimas proteolíticas, o que comprova sua natureza proteica, e mostrou-se termolábil, o que corrobora relatos de outros autores (Reeves, 1972; Cascales *et al.*, 2007). A semelhança entre estes resultados e aqueles obtidos para a fração S-75 indica a possibilidade de que a(s) proteína(s) presente(s) nos extratos intracelular e extracelular seja(m) a(s) mesma(s).

A proteína purificada por etapas sucessivas de cromatografia apresentou massa molecular média estimada de 18,56kDa. A comparação da sequência N-terminal da bacteriocina revelou 100% de identidade com oito proteínas diferentes

depositadas no BLAST, as quais são produzidas por bactérias em condições de limitação de nutrientes. Como a produção de colicinas pode ser mediada pela resposta do sistema SOS (Cascales *et al.*, 2007), condições de estresse, como limitação de nutrientes, são fatores que podem estimular sua expressão, conferindo vantagem seletiva à amostra produtora.

A proteína de membrana PexB e a proteína Dps, ambas sintetizadas por *E. coli*, apresentam massa molecular de 18kDa e 19kDa, respectivamente, e 100% de identidade de sequência (20 aminoácidos da extremidade N-terminal) com a proteína purificada neste estudo (Almiron *et al.*, 1992; Lomovskaya *et al.*, 1994). O sequenciamento completo da bacteriocina é um passo fundamental para que se possa determinar se ela é uma *nova* proteína ou uma proteína previamente descrita que expressa uma atividade não detectada anteriormente. De fato, não existem relatos na literatura disponível de substâncias antagonistas de natureza proteica com massa molecular estimada em cerca de 18.5kDa. No que se refere a esta característica, a bacteriocina detectada não se enquadra nas definições de colicina ou microcina atualmente aceitas (Pons *et al.*, 2002; Heng & Jack, 2006; Cascales *et al.*, 2007). Assim, avaliados em conjunto, os dados sugerem que a substância antagonista purificada e caracterizada neste estudo representa uma *nova* bacteriocina.

Novas abordagens terapêuticas de doenças infecciosas vêm sendo avaliadas e têm sido consideradas cada vez mais relevantes, uma vez que as taxas de multirresistência bacteriana a drogas antimicrobianas têm crescido de maneira alarmante. Uma das aplicações possíveis das bacteriocinas é a utilização para prevenção e tratamento de doenças infecciosas (Gillor & Ghazaryan, 2007). Em relação às bactérias Gram negativas, esta abordagem é ainda mais relevante, devido à disponibilidade cada vez mais limitada de antimicrobianos eficazes no tratamento de pacientes com infecções graves, especialmente em ambiente hospitalar. A utilização de antibióticos de amplo espectro está associada ao aumento de resistência bacteriana a drogas, tanto de agentes etiológicos do processo infeccioso como de membros da microbiota indígena. O espectro limitado de atividade das bacteriocinas pode ser uma característica favorável, que possibilitaria a ação específica contra as bactérias alvo.

Outra aplicação potencial das bacteriocinas é a conservação de alimentos (De Vuyst & Leroy, 2007; Galvez *et al.*, 2008). Embora a maioria dos estudos relativos a esta aplicação prática esteja relacionada a bactérias Gram positivas, principalmente bactérias lácticas (Jack *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 2002, Carvalho *et al.*, 2006), a possibilidade de emprego de bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas na indústria alimentícia deve ser considerada. Como exemplo, Pomares *et al.* (2009) relatam que modificações estruturais na microcina J25 aumentam seu potencial na inibição de contaminantes bacterianos de alimentos.

A otimização das condições de purificação e o sequenciamento completo da bacteriocina, bem como estudos referentes ao mecanismo de ação da proteína e investigações mais detalhadas do espectro de atividade da substância devem, obrigatoriamente, preceder qualquer proposta de aplicação prática da mesma.

Visando à avaliação fenotípica e genotípica de bacteriocinogenia em *Shigella*, foram estudadas 16 amostras de *S. sonnei*, grupo teste incluído no artigo 1, e 11 amostras de *S. flexneri*, 10 isoladas de crianças com diarreia aguda e uma amostra de referência. No que se refere à análise fenotípica, foram empregadas como reveladoras amostras de *E. coli* K12 Row sem plasmídeo e transformantes que albergavam diferentes plasmídios associados à síntese de 22 colicinas e seis microcinas.

Nove amostras de *S. sonnei* exibiram atividade antagonista contra *E. coli*, as mesmas amostras que expressaram antagonismo na investigação relatada no artigo 1. Apenas uma amostra de *S. flexneri* produziu substâncias antagonistas contra *E. coli* nas condições testadas, também a mesma ativa contra outras bactérias diarreiogênicas (dados não apresentados nos artigos). Como esperado, todas as amostras que expressaram antagonismo foram ativas contra *E. coli* K12 Row, considerada reveladora universal, suscetível a todas as colicinas exceto a colicina Js (Smarda *et al.*, 1987). Os testes fenotípicos revelaram a ocorrência de seis (60,0%) perfis diferentes de amostras reveladoras suscetíveis.

O resultado referente à frequência de expressão de antagonismo por *S. flexneri* corrobora dados da literatura, que apontam a produção de substâncias

antagonistas por 3 a 30% das amostras da bactéria (Reeves, 1972). Tanto isoantagonismo como heteroantagonismo foram observados para *S. flexneri*. Assim como relatado para as amostras de *S. sonnei*, não foi detectada a expressão de autoantagonismo, o que, como mencionado, está de acordo com dados da literatura, que indicam que colicinas não exibem atividade autoantagonista (Cascales *et al.*, 2007).

Todas as amostras de *Shigella* albergavam pelo menos um determinante colicinogênico. Dez dos 22 plasmídios associados à codificação de colicinas foram observados em *S. sonnei* e seis em *S. flexneri*. Dez amostras de *S. sonnei* e três de *S. flexneri* albergavam determinantes para codificação de microcinas, duas em *S. sonnei* e uma em *S. flexneri*. Deve-se ressaltar que a produção de microcinas é detectada quase exclusivamente em *E. coli* (Pons *et al.*, 2002; Duquesne *et al.*, 2007). É possível que as condições experimentais empregadas não tenham sido adequadas para a expressão de antagonismo por todas as amostras ou algumas amostras indicadoras expressem imunidade, embora não produzam determinada bacteriocina (Cooper & James, 1984; Lau *et al.*, 1984), ou ainda que sejam resistentes ou tolerantes à mesma (Riley, 1998).

Plasmídios pequenos, responsáveis pela síntese de colicinas do grupo A, como as nucleases E7 e E4, foram os mais comumente detectados no estudo. Em relação à frequência de detecção de cada determinante de bacteriocina destacam-se pColE4, presente em todas as amostras de *Shigella* estudadas, e pColE7. Colicinas com atividade de nuclease também foram frequentemente detectadas em *E. coli* (Gordon *et al.*, 1998).

Mais de 90% das amostras albergavam múltiplos genes que codificam a síntese de colicinas. Amostras de *S. sonnei* albergavam pelo menos três determinantes colicinogênicos e até 10 marcadores foram observados na mesma amostra. No total, 22 diferentes combinações de genes foram detectadas no grupo estudado. Frequência elevada de detecção de múltiplos determinantes bacteriocinogênicos foi relatada por Schamberger & Diez-Gonzales (2004) e Gordon & O'Brien (2006) para *E. coli*. Entretanto, segundo Cascales *et al.* (2007), amostras colicinogênicas de *E. coli* carregam apenas um plasmídio associado à síntese destas substâncias.

Segundo Gordon & O'Brien (2006), a síntese de múltiplas colicinas representa uma vantagem seletiva para a amostra produtora.

SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

S. flexneri e, especialmente, *S. sonnei* expressaram atividade contra outras bactérias diarreio gênicas e *E. coli* K12 Row, observando-se relações de isoantagonismo e heteroantagonismo. Autoantagonismo e antagonismo contra membros da microbiota intestinal indígena não foram detectados.

A exclusão de fatores que poderiam interferir na interpretação dos resultados dos testes fenotípicos reforça a hipótese de que o antagonismo pode ser atribuído à síntese de substância(s) de natureza proteica, possivelmente bacteriocina(s).

Condições de cultivo e fase de crescimento bacteriano influenciaram a expressão de antagonismo por *S. sonnei*.

A propriedade “produção de atividade antibacteriana” mostrou-se distribuída de forma homogênea na população de *S. sonnei* SS9.

As frações intracelular (C-75) e extracelular (S-75) precipitada com 75% de sulfato de amônio apresentaram estabilidade frente a diferentes valores de pH, termolabilidade e sua natureza proteica foi confirmada pela inativação após tratamento com proteases.

Os resultados obtidos durante a etapa de purificação indicam que, provavelmente, mais de uma bacteriocina está presente na fração C-75.

Após passos sequenciais de cromatografia, a massa molecular da bacteriocina purificada foi estimada em 18,56 kDa e sua sequência N-terminal determinada.

Todas as amostras de *S. sonnei* e *S. flexneri* carregavam pelo menos um determinante de bacteriocinogenia e cerca de 40% delas, quase exclusivamente *S. sonnei*, expressaram antagonismo contra *Escherichia coli* K12 Row e transformantes que albergam diferentes plasmídios associados à síntese de colicinas e microcinas.

Amostras de *S. sonnei* e *S. flexneri* comumente carregavam múltiplos determinantes de bacteriocinogenia em diversas combinações diferentes, mais

frequentemente plasmídios colicinogênicos que genes associados à síntese de microcinas.

Variações nos perfis de amostras suscetíveis sugerem que diferentes substâncias antagonistas são sintetizadas pelas amostras de *Shigella*.

Concluindo, bacteriocinogenia é uma habilidade frequentemente observada em amostras de *S. sonnei* e *S. flexneri*, que albergavam, na imensa maioria das vezes, múltiplos determinantes genéticos associados à síntese de bacteriocinas, especialmente, colicinas. O dado sugere a relevância destas substâncias antagonistas, mediando as relações ecológicas entre grupos bacterianos. Embora potencialmente produtoras de bacteriocinas, muitas vezes a característica não é expressa, especialmente por *S. flexneri*.

O espectro de atividade antagonista das amostras de *S. sonnei* e as condições de cultivo mais favoráveis para expressão de antagonismo sugerem que a(s) bacteriocina(s) produzidas não desempenham papel na competição entre a bactéria e membros da microbiota intestinal indígena dominante. Entretanto, é possível que a expressão de bacteriocinas contribua para a virulência de *S. sonnei* em momento que antecede a infecção, conferindo vantagem na competição contra outros organismos diarreiogênicos.

A bacteriocina purificada a partir da amostra de *S. sonnei* SS9 correspondente a uma nova bacteriocina, visto que nenhuma outra proteína com atividade antibacteriana já descrita apresenta massa molecular semelhante e identidade de sequência N-terminal. É possível que ela seja uma nova proteína ou, alternativamente, uma proteína já descrita com uma função ainda não detectada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aasen IM, Moretro T, Katla T, Axelsson L. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 159-166, 2000.

Abbott JD & Shannon R. A method for typing *Shigella sonnei*, using colicine production as a marker. *J Clin Pathol*, 11: 71-77, 1958.

Al-Hasani K, Adler B, Rajakumar K, Sakellaris H. Distribution and structural variation of the *she* pathogenicity island in enteric bacterial pathogens. *J Med Microbiol*, 50: 780-786, 2001a.

Al-Hasani K, Rejakumar K, Bulach D, Robins-Browne R, Adler B, Sakellaris H. Genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. *Microb Pathog*, 30: 1-8, 2001b.

Almirón M, Link AJ, Furlong D, Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 6 (12B): 2646-2654, 1992.

Amako K, Matsuguchi M, Takeya K, Tatsuta E, Takagi Y. Purification and the ultrastructure of a bacteriocin produced from *Shigella sonnei* strain 100052. *Antimicrob Agents Chemother*, 14: 488-492, 1978.

Apolônio ACM, Carvalho MAR, Bemquerer MP, Santoro MM, Pinto SQ, Oliveira JS, Santos KV, Farias LM. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. *J Appl Microbiol*, 104: 508-514, 2007b.

Aranda-Michel J & Gianella RA. Acute diarrhea: a practical review. *Am J Med*, 106: 670-676, 1999.

Baquero F, Moreno F. The microcins. *FEMS Microbiol Lett*, 23: 117-124, 1984.

Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. *Bull World Health Organ*, 86: 710-717, 2008.

Braun V, Pils H, Grob P. Colicins: structures, mode of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch Microbiol*, 161: 199-206, 1994.

Buchanan SK, Lukacik P, Grizot S, Ghirlando R, Ali MMU, Barnard TJ, Jakes KS, Kienker PK, Esser L. Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO J*, 26: 2594-2604, 2007.

Bures J, Hórák V, Duben J. Importance of colicinogeny for the course of acute bacillary dysentery. *Zbl Bakt Hyg*, 245: 469-475, 1979.

Carvalho AAT, Paula RA, Mantovani HC, Moraes CA. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiol*, 23: 213-219, 2006.

Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubès R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71: 158-229, 2007.

Castillo FJ, Carranza E, Clavel A, Rubio MC, Gomez-Lus R. Epidemiology of shigellosis and colicin typing of *Shigella sonnei*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 9: 530-536, 1991.

Chan-Teoh CH, Wong WT, Huang CT, Shum H. Colicine types of *Shigella sonnei* isolated in Hong Kong. *J Clin Path*, 24: 636-640, 1971.

Cheasty T, Day M, Threlfall EJ. Increasing incidence of resistance to nalidixic acid in shigellas from humans in England and Wales: implications for therapy. *Clin Microbiol Infect*, 10: 1033-1035, 2004.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Enteric parasites and AIDS. *São Paulo Med*

J, 117: 266-273, 1999.

Christopher PR, David KV, John SM, Sankarapadian V. Antibiotic therapy for *Shigella dysentery*. *Cochrane Database Syst Ver*, 8: CD006784, 2010.

Cooper PC, James R. Two news E colicins, E8 and E9, produced by a strain of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 130: 209-215, 1984.

Daw MA, Falkiner FR. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, 27: 467-479, 1996.

De Vuyst L & Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol microbial biotechnol*, 13 (4): 194-199, 2007.

Dellert SF, Cohen MB. Diarrheal disease. Established pathogens, new pathogens, and progress in vaccine development. *Gastroenterol Clin North Am*, 23: 637-654, 1994.

Dhillon TS, Hui YW, Teoh-Chan CH, Dhillon EKS. Accessory replicons of species of *Salmonella* and *Shigella*. *Appl Environ Microbiol*, 44: 825-831, 1982.

Doré J, Corthier G. The human intestinal microbiota. *Gastroenterol Clin Biol*, 34 (Suppl 1): S7-S15, 2010.

Duché D. Colicin E2 is still in contact with its receptor and import machinery when its nuclease domain enters the cytoplasm. *J Bacteriol*, 189: 4217-4222, 2007.

Duché D, Frenkian A, Prima V, Lloubès R. Release of immunity protein requires functional endonuclease colicin import machinery. *J Bacteriol*, 188: 8593-8600, 2006.

Duquesne S, Garzón D, Pedduzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded

antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*, 24: 708-7034, 2007.

Farias LM, Carvalho, MAR, Damasceno CAV, Cisalpino EO, Vieira EC. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. *Res Microbiol*, 143: 151-159, 1992.

Farias LM, Totola AH, Miranda CM, Carvalho MA, Damasceno CA, Tavares CA, Cisalpino EO, Vieira EC. Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicilata*. *Res Microbiol*, 145: 9-16, 1994.

Farkas-Himsley H, Pagel A. Bacteriocin typing by leakage of ultraviolet light-absorbing material. *Infect Immun*, 16: 12-19, 1977.

Fernandez MI & Sansonetti PJ. Effector molecules of *Shigella* pathogenesis and host responses. In: Hecht GA (Ed.). *Microbial Pathogenesis and the Intestinal Epithelial Cell*. Washington: ASM Press, 2003. cap. 25, p. 455-479.

Frankel G, Riley L, Giron JA, Valmassoi J, Friedmann A, Strockbine N, Falkow S, Schoolnick GK. Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. *J Infect Dis*, 161: 1252-1256, 1990.

Galvez A, Lopes RL, Abriouel H, Valdivia E, Omar NB. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 28 (2): 125-152, 2008.

Gillies RR. Colicine production as an epidemiological marker of *Shigella sonnei*. *J Hyg*, 62: 1-9, 1964.

Gillor O, Ghazarvan L. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2(2): 115-122, 2007.

Gillor O, Kirkup BC, Riley MA. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv Appl Microbiol*, 54: 129-146, 2004.

Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin in *Escherichia coli*. *Microbiol*, 152: 3239-3244, 2007.

Gordon DM, Riley MA, Pinou T. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiol*, 144: 2233-2249, 1998.

Hao WL & Lee YK. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol*, 268: 491-502, 2004.

Heng NCK, Jack RW. Microcins. In: Kastin AJ (Ed.) *Handbook of Biologically Active Peptides*. Maryland Heights: Elsevier, 2006. P.75-81.

Hentges DJ. Inhibition of *Shigella flexneri* by the normal intestinal flora. *J Bacteriol*, 97: 513-517, 1969.

Hernández-Chico, San Millán JL, Kolter R, Moreno F. Growth phase and OmpR regulation of transcription of microcin B17 genes. *J Bacteriol*, 167: 1058-1065, 1986.

Horak V. Seventy colicin types of *Shigella sonnei* and an indicator system for their determination. *Zentralbl Bakteriol*, 281: 24-29, 1994.

Houng HSH, Sethabutr O, Echeverria P. A simple polymerase chain reaction technique to detect and differentiate *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in human feces. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 28: 19-25, 1997.

Ina K, Kusugami K, Ohta M. Bacterial hemorrhagic enterocolitis. *J Gastroenterol*, 38: 111-120, 2003.

Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev*, 59: 171-200. 1995.

Jennison AV & Verma NK. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev*, 28: 43-58, 2004.

Jezirowski A, Gordon DM. Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 189: 7045-7052, 2007.

Kaper JB, Sperandio V. Bacteria cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun*, 73: 3197-3209, 2005.

Kingombe CIB, Cerqueira-Campos ML, Farber JM. Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Food Prot*, 68: 239-245, 2005.

Kolter R, Moreno F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu Rev Microbiol*, 46: 141-463, 1992.

Konisky J. The Bacteriocins. In: Ornston LN & Sokatch JR. *The bacteria*. London: Academic Press Inc, 1978. v. 6., cap. 2, p.71-136.

Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infection: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*, 77: 651-666, 1999.

Lau PC, Rowsome RW, Watson RJ, Visentim LP. The immunity genes of colicins E2 and E8 are closely related. *Biosci Rep*, 4: 565-572, 1984.

Lima AAM, Lima NL, Pinho MCN, Barros Jr EA, Teixeira MJ, Martins MCV, Guerrant RL. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin,

trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 256-259, 1995.

Lima FL, Carvalho MAR, Apolônio ACM, Bemquerer MP, Santoro MM, Oliveira JS, Alviano CS, Farias LM. Actinomycetemcomitin: a new bacteriocin produced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Res Microbiol*, 153: 249-252, 2002.

Lima FL, Farias FF, Carvalho MAR, Alviano CS, Farias LM. Influence of abiotic factors on the bacteriocinogenic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Res Microbiol*, 153: 249-252, 2002a.

Lomovskaya OL, Kidwell JP, Matin A. Characterization of the δ^{38} – dependent expression of a core *Escherichia coli* starvation gene, *pexB*. *J Bacteriol*, 176: 3928-3935, 1994.

Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*, 69: 1035S-1045S, 1999.

Masi M, Vuong P, Humbard M, Malone K, Misra R. Initial steps of colicin E1 import across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 189: 2667-2676, 2007.

McGeachie J & McCormick W. Importance of potency in typing by colicine production. *J Clin Path*, 20: 887-891, 1967.

Medeiros MIC, Neme SN, da Silva P, Capuano DM, Errera MC, Fernandes SA, do Valle GR, de Ávila FA. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*, 43: 21-24, 2001.

Merino LA, Hrenuk GE, Alonso JM, Ronconi MC. Value of antibiotype and bacteriocinotype for differentiating *Shigella* strains isolated in Argentina. *Bull Soc*

Pathol Exot, 93: 307-310, 2000.

Miranda CM, Farias LM, Carvalho MA, Damasceno CA, Totola AH, Tavares CA, Cisalpino EO, Vieira EC. Purification and partial characterization of a bacteriocin isolated from *Bacteroides ovatus* H47. *Can J Microbiol*, 39: 167-174, 1993.

Morris GK & Wells J. Colicin typing of *Shigella sonnei*. *Appl Microbiol*, 27: 312-316, 1974.

Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. v. 1, cap. 43, p. 670-687.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11: 142-201, 1998.

Navaneethan U, Gianella RA. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 5: 637-647, 2008.

Navia MM, Ruiz J, Vila J. Molecular characterization of the integrons in *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 48: 175-179, 2004.

Nguyen TV, Le PV, Le CH, Weintraub A. Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 816-819, 2005.

Niyogi SK. Shigellosis. *J Microbiol*, 43: 133-143, 2005.

Niyogi SK, Vargas M, Vila J. Prevalence of the *sat*, *set* and *sen* genes among diverse serotypes of *Shigella flexneri* strains isolated from patients with acute

diarrhoea. *Clin Microbiol Infect*, 10: 574-576, 2004.

Noriega FR, Liao FM, Formal SB, Fasano A, Levine MM. Prevalence of *Shigella* enterotoxin 1 among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. *J Infect Dis*, 172: 1408-1410, 1995.

Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? *Nutr Rev*: 257-268, 2010.

Ohl ME & Miller SI. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*, 52: 259-274, 2001.

Oliveira AAP, Farias LM, Nicoli JR, Costa JE, Carvalho MAR. Bacteriocin production by *Fusobacterium* isolates recovered from the oral cavity of human subjects with and without periodontal disease and of marmosets. *Res Microbiol*, 149: 585-594, 1998.

O'Sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84 (5-6): 593-604, 2002.

Padilla C, Lobos O, Brevis P, Abaca P, Hubert E. Plasmid-mediated bacteriocin production by *Shigella flexneri* isolated from dysenteric diarrhoea and their transformation into *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*, 42: 300-303, 2006.

Padilla C, Lobos O, Hubert E. *Shigella flexneri* strains produce bacteriocins active against members of the human microbial intestinal flora. *Rev Latinoam Microbiol*, 46 (3-4): 85-88, 2004.

Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett*, 252: 11-18, 2005.

Pilsl H, Smajs D, Braun V. The tip of the hydrophobic hairpin of colicin U is dispensable for colicin U activity but is important for interaction with the immunity

protein. *J Bacteriol*, 180: 4111-4115, 1998.

Pomares MF, Salomón RA, Pavlova O, Severinov K, Farias R, Vincent PA. Potential applicability of chymotrypsin-susceptible microcin J25 derivatives to food preservation. *Appl Environ Microbiol*, 75 (17): 5734-5738, 2009.

Pons AM, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, 84: 531-537, 2002.

Portrait V, Cottenceau G, Pons AM. A *Fusobacterium mortiferum* strain produces a bacteriocin-like substance(s) inhibiting *Salmonella enteritidis*. *Lett Appl Microbiol*, 31: 115-117, 2000.

Pugsley AP. The ins and outs of colicins. Part II. Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiol Sci*, 1: 203-205, 1984.

Rambaud JC. Bacterial ecology of the digestive tract and defense of the body. *Ann Gastroenterol Hepatol*, 28: 263-266, 1992.

Reeves P. The bacteriocins. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1972. 142p.

Reller LB. Colicin typing as an epidemiological tool in the investigation of outbreaks of *Shigella sonnei*. *Appl Microbiol*, 21: 21-26, 1971.

Rezwan F, Lan R, Reeves PR. Molecular basis of the indole-negative reaction in *Shigella* strains: extensive damages to the *tna* operon by insertion sequences. *J Bacteriol*, 186: 7460-7465, 2004.

Ribeiro-Ribas RN, Carvalho MAR, Vieira CA, Apolônio ACM, Magalhães PP, Mendes EN, Oliveira JS, Santoro MM, Farias LM. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by an oral *Fusobacterium nucleatum*

isolate. *J Appl Microbiol*, 197: 699-705, 2009.

Riley MA. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu Rev Genet*, 32: 255-278, 1998.

Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol*, 7: 129-133, 1999.

Riley MA, Wertz JE. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84: 357-364. 2002.

Rúgeles LC, Bai J, Martínez AJ, Vanegas MC, Gómez-Duarte OG. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stool samples and food products in Colombia. *Int J Food Microbiol*, 138: 282-286, 2010.

Savage DC. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. *Food Technol*, 82-87, 1987.

Schamberger GP & Diez-Gonzalez F. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Food Prot*, 67(3): 486-492, 2004.

Sekirov I, Russel SL, Antunes CM, Finlay B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 90: 859-904, 2010.

Smajs D, Pils H, Braun V. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J Bacteriol*, 179: 4919-4928, 1997.

Smajs D & Weinstock GM. The iron- and temperature-regulated *cjrBC* genes of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains code for colicin Js uptake. *J Bacteriol*, 183: 3958-3966, 2001a.

Smajs D & Weinstock GM. Genetic organization of plasmid ColJs, encoding colicin Js activity, immunity, and release genes. *J Bacteriol*, 183: 3949-3957, 2001b.

Smarda J, Petrzalova J, Vyskot B. Colicin Js of *Shigella sonnei*: classification of type colicin "7". *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*, 263: 530-540, 1987.

Smarda J, Smajs D. Colicins: exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Fol Microbiol*, 43: 563-582, 1998.

Sousa MAB. Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte/MG: pesquisa de *Shigella* e *Salmonella enterica*. Dissertação, Mestrado em Microbiologia, UFMG, 2005.

Svensson L, Bergquist J, Wenneras C. Neuromodulation of experimental *Shigella* infection reduces damage to the gut mucosa. *Microbes Infect*, 6: 256-264, 2004.

Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci*, 52: 2069-2077, 2007.

Thong KL, Hoe SLL, Puthucheary SD, Yasin RM. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. *BMC Infect Dis*, 5: 8, 2005.

Tigyi Z, Kispal G, Pal T. Identification of the plasmid and the structural gene of colicin type 7 of *Shigella sonnei*. *Acta Biol Hung*, 56: 359-373, 2005.

Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'acqua L, Gaione P, Méndez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuna AM, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol*, 39: 2134-2139, 2001.

Toshima H, Yoshimura A, Arikawa k, Hidaka A, Ogasawara J, Hase A, Masaki H, Nishikawa Y. Enhancement os Shiga Toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase Colicins. *Appl Environ Microbiol*, 73: 7582-7588, 2007.

Vargas M, Gascon J, Anta MTJ, Vila J. Prevalence of *Shigella* enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol*, 37: 3608-3611, 1999.

Verluyten J, Leroy F, de Vuyst L. Influence of complex nutrient source on growth of an Curvacin A production by sausage isolated *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5081-5088, 2004.

Vu DT VD, Sethabutr O, Von Seidlein L, Tran VT, Do GC, Bui TC, Le HT, Lee H, Houg HS, Hale TL, Clemens JD, Mason C, Dang DT. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J Clin Microbiol*, 42: 2031-2035, 2004.

Wei J, Goldberg MB, Burland V, Venkatesan MM, Deng W, Fournier G, Mayhew GF, Plunkett G 3rd, Rose DJ, Darling A, Mau B, Perna NT, Payne SM, Runyen-Janecky LJ, Zhou S, Schwartz DC, Blattner FR. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T. *Infect Immun*, 71: 2775-2786, 2003.

Wilson KH. Ecological concepts in the control of pathogens. In: Roth JA. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995, cap. 15, p. 245-256.

Xu J, Gordon JI. Honor the symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10452-10459, 2003.

Yamamoto Y, Togawa Y, Shimosaka M, Osaki M. Purification and characterization

of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microbiol*, 69: 5746-5753, 2003.

Zhang Y, Vankemmelbeke MN, Holland LE, Walker DC, James R, Penfold CN. Investigating early events in receptor binding and translocation of colicin E9 using synchronized cell killing and proteolytic cleavage. *J Bacteriol*, 190: 4342-4350, 2008.