

JULIANA TEIXEIRA DE MAGALHÃES NEVES

**CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E IDENTIFICAÇÃO DE**  
***Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa  
de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola,  
para obtenção do título de  
“Doctor Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

## RESUMO

NEVES, Juliana Teixeira de Magalhães, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2003. **Características moleculares e identificação de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Marisa Vieira Queiroz

A estirpe probiótica *Lactobacillus* UFV H2b20, previamente classificada como *Lactobacillus acidophilus* por suas características de fermentação de açúcares, apresentou-se mais semelhante à espécie *Lactobacillus delbrueckii*, quanto à seqüência de rDNA 16S, o que levou ao questionamento acerca da identidade da linhagem. Para o esclarecimento da real classificação da linhagem, o método de hibridização DNA-DNA foi empregado. A linhagem apresentou 75,2% e 77,4% de reassociação com *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC 12315) e *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (ATCC 9649), respectivamente. Dado que a homologia de 70% ou mais, por esse método, tem sido usada como padrão para agrupamento de bactérias em uma mesma espécie, sugere-se, aqui, que *Lactobacillus* UFV H2b20 seja, daqui para frente, denominado *L. delbrueckii* UFV H2b20. Identificada a linhagem, outro objetivo do trabalho era desenvolver um protocolo para detecção *in situ* de *L. delbrueckii*. Uma sonda de 26 nucleotídeos (SA) foi construída e testada com outras espécies de *Lactobacillus* relacionadas

geneticamente entre si. Estes estudos demonstraram que a seqüência de assinatura (SA) estava presente em *L. delbrueckii* UFV H2b20, *L. delbrueckii* UFV H2b21, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* e *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, o que indica ser ela eficaz para ser usada como sonda para rRNA 16S espécie-específica pelo método de FISH. A hipótese de existência de polimorfismos, levantada em trabalhos prévios no rDNA 16S da linhagem, foi confirmada após as análises dos segmentos de DNA clonados e selecionados do banco genômico construído para a linhagem *L. delbrueckii* UFV H2b20. As seqüências analisadas demonstraram, também, presença de segmentos correspondentes a quatro genes codificadores de rRNA 16S distintos, e seis segmentos distintos para uma mesma região de rRNA 23S, indicando seis operons putativos. Há evidência de, pelo menos, um operon putativo completo seguido de região codificadora de seis tRNAs. Não se detectou região espaçadora longa entre rDNA 16 e 23S.

## ABSTRACT

NEVES, Juliana Teixeira de Magalhães, Universidade Federal de Viçosa, February, 2003. **Molecular characterization and identification of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Marisa Vieira Queiroz

*Lactobacillus* UFV H2b20, a probiotic strain, previously identified as *Lactobacillus acidophilus* due to its sugar fermentation pattern, was found to be more closely related to *Lactobacillus delbrueckii* regarding its 16S rDNA sequence. It was demonstrated by DNA-DNA hybridization that this strain presented 75.2% and 77.4% of reassociation with *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315 and *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649, respectively. These results place *Lactobacillus* UFV H2b20 within the *L. delbrueckii* species, for 70% reassociation as measured by the method used has been a standard to cluster bacteria within the same species. A protocol for in situ detection of *L. delbrueckii* was developed by means of Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH. A probe consisting of 26 nucleotides labeled with rhodamine was designed based on the signature sequence within the rDNA, and was tested against genetically related *Lactobacillus* species. A species-specific method was obtained capable of discriminating *L. delbrueckii* strains from other *Lactobacillus* species. Previous studies raised the hypothesis of

polymorphism among the copies of 16S rDNA in *L. delbrueckii* UFV H2b20. This was confirmed by sequence analysis of rDNA from a gene library of this strain cloned in phage lambda and subcloned in pBluescript. Sequence analyses of cloned fragments demonstrated the presence of at least four distinct genes encoding 16S rRNAs. Distinct fragments containing 23S rRNA related genes indicated six putative *rrn* operons. One complete putative *rrn* operon displays a region encoding 6 different tRNAs. Long spacer regions between 16S and 23S rDNA were not detected.