

LEONARDO MAESTRI TEIXEIRA

Caracterização fisiológica e genética do *Lactobacillus delbrueckii*
UFV H2b20 desprovido da capacidade de imunoestimulação

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das Exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, Para a obtenção do
título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

EXTRATO

TEIXEIRA, Leonardo Maestri, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2004.
Caracterização fisiológica e genética do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 desprovido da capacidade de imunoestimulação. Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Hilário Cuquetto Mantovani.

Foi feita a caracterização de um mutante espontâneo do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 que mostrou-se desprovido da capacidade de imunoestimulação e também a investigação do possível papel da seqüência de inserção ISLdH2b20 nessa mutação. A confirmação da identidade genética de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com a do mutante desprovido da capacidade de imunoestimular o hospedeiro foi realizada por análise dos perfis de PCR-DGGE. Ambas bactérias apresentaram na microscopia eletrônica de transmissão característica peculiar do H2b20, a de formar bastonete alongado quando na fase estacionária. As células do mutante mostraram-se com diâmetro maior do que as da cultura do *L. delbrueckii* UFV H2b20, porém as velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{\max}) foram iguais. As células do mutante sofrem lise mais rápida do que as da cultura original selvagem quando em presença de baixas concentrações de mutanolisina, no entanto, o perfil de lise é idêntico em presença de lisozima. A hidrofobicidade de superfície das células, determinada pelo teste de MATH, é maior nas células da cultura original do *L. delbrueckii* UFV H2b20. Os perfis de proteínas de superfície não se distinguem quanto ao número e posição das bandas em SDS-PAGE, contudo a banda referente à proteína de aproximadamente 36kDa apresentou mais proteína nos extratos do tipo selvagem do que a do mutante. O mutante apresentou uma maior quantidade de proteínas em quase todas as outras bandas, com destaque para duas bandas, 60 kDa e 75 kDa. O estudo de distribuição da ISLdH2b20 nos isolados selvagem e mutante, feito por análise de Southern, mostrou mesmo perfil de distribuição dessa seqüência de inserção nos dois

isolados. Os resultados indicam a possível participação de uma proteína de 36 kDa no processo de imunoestimulação do H2b20, possivelmente da camada S, e que a instabilidade desse, quanto à capacidade de imunoestimulação, não tem a participação direta da seqüência de inserção ISLdH2b20 em particular.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Leonardo Maestri, M.S. Universidade Federal de Viçosa, May of 2004.
Genetic and physiologic characterization of a *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 mutant unable of immunestimulation. Adviser: Célia Alencar de Moraes.
Committee Members: Marisa Vieira de Queiroz and Hilário Cuquetto Mantovani.

A mutant of *L. delbrueckii* UFV H2b20, without the capacity of immunestimulation, was characterized and the possible role of the insertional sequence ISLdH2b20 in this mutation also. PCR-DGGE confirmed its genetic identity as *L. delbrueckii* UFV H2b20. Transmission electron microscopy demonstrated the characteristic morphology of the cells in the stationary phase, when they appeared as long rods with 0,653 μ m diameter, for the wild type, and 0,735 μ m, for the mutant. Maximum specific growth rate (μ_{max}) was similar for both cultures. The effect of lysozyme on cells of H2b20 and mutants was the same; however, mutanolysin had a more rapid lytic effect on mutant cells, when in lower concentrations. The superficial hydrophobicity of the cells, determined by microbial adhesion to hexadecane (MATH) is higher in wild type cells. The profiles protein of superficial proteins, by SDS-PAGE, are similar when the position and number of bands are considered, however, the band represented by one protein with approximately 36kDa showed more protein in the wild type extract than in the mutant extract. The mutant presented more proteins in almost all of the other bands, especially in the two bands representing proteins with 60kDa and 75kDa. The consolidated results point to a possible role for the 36kDa protein in the immunestimulation capacity of the wild type cells. This is possible the S-layer protein of *L. delbrueckii* UFV H2b20. *Southern* analysis of the wild type and the mutant's DNAs indicated no difference in the distribution of the several copies of ISLdH2b20 between the two strains. This leads to the conclusion that the mutation, which introduced to loss of the immunestimulation capacity, is not the result transposition of this putative element.