

FERNANDA ARRUDA FLORESTA

**Análise de Região Codificadora de rRNA de
Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20: Filogenia e Presença
de Seqüência de Inserção Putativa**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F634a
2003

Floresta, Fernanda Arruda, 1977-

Análise de região codificadora de rRNA de
Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20: filogenia e
presença de sequência de inserção putativa / Fernanda
Arruda Floresta. – Viçosa : UFV, 2003
54p. : il.

Orientador: Célia Alencar de Moraes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Viçosa

1. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 - Filogenia. 2.
Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 - Operon *rrn*. 3.
Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 - Identificação. 4.
Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 - Caracterização.
5. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 - Sequência de
inserção. 6. Eletroforese em gel de gradiente de desnatura-
ção - Técnica. I. Universidade Federal de Viçosa. II.
Título.

CDD 19.ed. 589.950415

CDD 20.ed. 589.950415

FERNANDA ARRUDA FLORESTA

**ANÁLISE DE REGIÃO CODIFICADORA DE rRNA DE
Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20: FILOGENIA E PRESENÇA DE
SEQÜÊNCIA DE INSERÇÃO PUTATIVA**

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

APROVADA: 31 de março de 2003.

Prof. Marisa Vieira de Queiroz
(Conselheira)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof. Flávia Maria Lopes Passos

Prof. Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

A Deus

A meus pais Antônio Floresta e Carminha Arruda

A meus irmãos Flávia e Antônio José

A meu sobrinho Lucas

A Luiz Eduardo

A Maria Aparecida Medina e Maria Madalena de Souza (*in memoriam*).

AGRADECIMENTO

A Deus, pela proteção em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade de realização deste curso que me fez crescer como profissional e como pessoa.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação, pelas conversas esclarecedoras, pelo incentivo, pelo carinho e pelo voto de confiança, minha admiração como pesquisadora e, principalmente, como pessoa.

Aos professores Marisa Vieira de Queiroz e Everaldo Gonçalves de Barros pelo aconselhamento.

Aos professores Tótola e Flávia pelas sugestões.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, por todo conhecimento a mim transmitido.

A Nilcéa, Laura e D. Aparecida, pelo carinho, pela compreensão e, principalmente, por cuidarem de todos os “detalhes burocráticos”.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela colaboração e paciência.

A meus pais, Antônio e Carminha, pelo amor, pelo apoio incondicional, por terem aberto mão de seus próprios sonhos para que eu

pudesse realizar os meus e, principalmente, por serem minha referência de responsabilidade e caráter.

À Flávia e ao Antônio José, meus amados irmãos, pela paciência, pela compreensão nos momentos de fadiga e pelo agradável convívio em nosso lar.

Ao querido Luiz Eduardo, por ter aceitado os momentos de ausência, por ter acreditado em meus ideais e ter torcido pela concretização dos mesmos.

A todos do Laboratório de Microbiologia Industrial Cida, Patrícia, Marciana, Elisângela, Maurício, Néia, José Carlos, Alessandra, Sílvia, Manoela e especialmente à Simone pela grande amizade que foi conquistada.

Ao Leonardo Maestri, pela ajuda indispensável nas análises das seqüências.

Ao Prof. Tótola por ter disponibilizado o equipamento de DGGE e à Andréa Ribon, pela paciência e ajuda na realização dos experimentos.

À Juliana, pela acolhida em sua casa e em seu trabalho.

Ao Prof. Júlio Cascardo do Laboratório de Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), por ter possibilitado o seqüenciamento dos “nossos clones”. E, também, a todos os professores da UESC que me receberam com muito carinho.

Ao Prof. Gonçalo e ao Marcos Renato do Laboratório de Genômica e Expressão da Unicamp que realizaram o alinhamento das seqüências e prestaram valiosos esclarecimentos.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Genética e Micorriza pela agradável convivência.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA ARRUDA FLORESTA, filha de Antônio Nogueira Floresta e Maria do Carmo Arruda Floresta, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, no dia 27 de agosto de 1977.

Em março de 2001, graduou-se em Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em abril de 2001, iniciou, na mesma instituição, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Microrganismos	16
2.2. Purificação dos subclones	17
2.3. Seqüenciamento	17
2.4. Análise das seqüências	17
2.5. Extração de DNA total	19
2.6. Amplificação de fragmento de rDNA 16S de <i>Lactobacillus</i> para análise de DGGE	20
2.7. PCR – DGGE	22

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1. Sequenciamento dos subclones	23
3.2. Análise do conteúdo C + G	23
3.3. Filogenia e rDNA de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20	24
3.4. Perfil de PCR - DGGE de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20	28
CAPÍTULO 2	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Microrganismos	36
2.2. Seqüenciamento	36
2.3. Análise das seqüências obtidas	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

1. Classificação de *Lactobacillus*. Grupo *L. delbrueckii* 18
2. Troca de nucleotídeos nas seqüências de rDNA 16S 26

CAPÍTULO 2

1. Códon preferencialmente utilizados para a síntese de transposases 41

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

1. Árvore filogenética do grupo *Lactobacillus delbrueckii*, tendo como base de comparação as seqüências do rDNA 16S. 25
2. Árvore filogenética do grupo *Lactobacillus delbrueckii*, tendo como base de comparação as seqüências da região intergênica 16S-23S 27
3. Eletroforese em gel de agarose e em gel de gradiente desnaturante do produto da amplificação por PCR do fragmento de rDNA 16S de *Lactobacillus* 29

CAPÍTULO 2

1. Seqüência de nucleotídeos e componentes estruturais da seqüência de inserção putativa ISLdH2b20 40
2. Árvore de homologia tendo como base de comparação as seqüências de nucleotídeos de várias famílias de IS e de ISLdH2b20 43

RESUMO

FLORESTA, Fernanda Arruda, Universidade Federal de Viçosa, março 2003.
Análise de região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20: Filogenia e presença de seqüência de inserção putativa. Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Everaldo Gonçalves de Barros.

O estudo de filogenia baseado em seqüências de rDNA de *Lactobacillus* UFV H2b20 mostrou que esse microrganismo foi agrupado entre as subespécies de *Lactobacillus delbrueckii*. Este resultado confirma a nova classificação do isolado, baseada na hibridização DNA-DNA. A análise das substituições de bases mostra que a maioria é causada pela desaminação da 5-metilcitosina, o que causa uma transição GC/AT. A técnica PCR-DGGE de *L. delbrueckii* UFV H2b20 demonstrou resultados satisfatórios na análise de polimorfismos do operon *rrn* em microrganismos isolados. Foram encontradas cinco bandas diferentes para o *L. delbrueckii* UFV H2b20, confirmando a presença de cinco cópias distintas do rDNA 16S nesse microrganismo e possivelmente seis no total. O isolado *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou um perfil de bandas diferente das outras linhagens de *Lactobacillus*, o que poderá ser utilizado para diferenciá-lo dos demais, uma vez que outros métodos baseados em PCR, como RAPD, mostram-se pouco discriminatórios. A análise das seqüências da região do rDNA 16S

revelou uma seqüência de inserção putativa, de 915 pb, que foi caracterizada e denominada ISLdH2b20. Ela apresenta uma única ORF e codifica uma transposase putativa que apresenta homologia com a transposase de ISL5. Todos os elementos característicos de uma IS foram identificados bem como as seqüências regulatórias putativas da transposase.

ABSTRACT

FLORESTA, Fernanda Arruda, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2003. **Analysis of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20: Phylogeny and Presence of a Putative Insertion Sequence.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Committee Members: Marisa Vieira de Queiroz and Everaldo Gonçalves de Barros.

Phylogenetic analysis of *Lactobacillus* UFV H2b20 based on the 16S rDNA sequence positions this isolate among the *Lactobacillus delbrueckii* subspecies. It confirms the classification by DNA/DNA hybridization. Comparisons of the substituted bases along the 16S rDNA sequence show that most are probably caused by 5-methylcytosine deamination that results in GC/AT transition. Presence of polymorphic copies of the 16S rRNA gene in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 were confirmed by PCR-DGGE. Five distinct bands of rDNA amplified sequences confirm at least five different copies of the gene. The intensity of one of the bands allows the inference of two identical copies. The DGGE profile of this isolate was different from those of other *L. delbrueckii* strains, providing a mean to distinguish it in mixed cultures. Analysis of the nucleotide sequences along the rDNA region revealed the presence of putative insertion sequences. One of them, 915 bp

long, was characterized and denominated ISLdH2b20. It presents a single ORF that encodes a putative transposase with some homology to the one of ISL5 of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. All the characteristic elements of an IS were located as well as the putative regulatory sequences of the transposase.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Bactérias do ácido láctico são de grande importância nas indústrias de lácteos e de outros alimentos fermentados, sendo utilizadas como culturas *starter* na fabricação de vários produtos, a exemplo de iogurtes, queijos, chucrute, carnes fermentadas e vinhos (KLIJN et al. e HAMMES et al., 1991).

Filogeneticamente, entre as bactérias Gram positivas, as bactérias do ácido láctico pertencem ao ramo dos clostrídios, são catalase negativas, não formadoras de esporos, ocorrem nas formas de cocos ou bastonetes que possuem um conteúdo de bases C + G menor que 55% em seu DNA (HAMMES et al., 1991 e HOLZAPFEL et al., 1997). Esse grupo de bactérias necessita de um carboidrato fermentável para crescer, uma vez que em seus membros faltam porfirinas e citocromos, não possuem cadeia de transporte de elétrons e, assim, obtêm energia apenas pela fosforilação em nível de substrato. Glicose é convertida, principalmente, a ácido láctico nas espécies homofermentativas ou a ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) e etanol ou ácido acético, ou ambos, nas heterofermentativas (VANDAMME et al., 1996 e MADIGAN et al., 2000).

Em alimentos, as bactérias do ácido láctico contribuem para o sabor e a textura dos produtos fermentados e inibem o crescimento de bactérias deterioradoras pela produção de substâncias inibidoras de crescimento (bacteriocinas) e de grandes quantidades de ácido láctico e peróxido de hidrogênio (VAN DE GUCHTE et al., 2001 e VANDAMME et al., 1996). Os gêneros de importância em alimentos são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (VANDAMME et al., 1996).

Bactérias do ácido láctico também podem ser encontradas no trato gastrointestinal de homens e animais, bem como em alimentos fermentados.

Espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são utilizadas como probióticos (FULLER, 1989).

Probióticos são suplementos alimentares com microrganismos vivos que exercem efeitos benéficos no equilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro. Dentre as funções exercidas pelos probióticos, destacam-se a manutenção da microbiota normal, a imunoestimulação e imunomodulação, as atividades anticarcinogênica e antimutagênica, a proteção contra patógenos entéricos e a síntese de lactase *in vivo*, reduzindo os efeitos da intolerância à mesma (FULLER, 1989).

Além dessas funções, bactérias probióticas estão sendo estudadas como “veículos vivos de apresentação” que podem ser utilizadas para expressar vacinas, enzimas ou antimicrobianos em locais alvo no trato gastrointestinal, ou em outras superfícies mucosas do corpo (KLAENHAMMER, 1998).

O conhecimento genético básico das bactérias probióticas é crucial para o entendimento de suas características essenciais e dos sistemas de sinalização e resposta que são necessários para a sua funcionalidade *in vivo*. Entretanto, considerando a progressiva importância econômica, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são muito pouco caracterizados quando comparados a outros microrganismos de interesse industrial (KLAENHAMMER, 1998).

Lactobacillus UFV H2b20 foi isolado a partir de fezes de crianças recém nascidas alimentadas apenas com leite materno e caracterizado, por métodos fenotípicos, como *Lactobacillus acidophilus* e denominado *L. acidophilus* UFV H2b20 (SANTOS, 1984).

Esse microrganismo foi submetido, *in vitro*, a condições semelhantes às do trato gastrointestinal e mostrou resistência à lisozima, a ácido clorídrico e a sais biliares, bem como potencial para instalar-se em condições de desequilíbrio da microbiota intestinal, uma vez que sobreviveu e pôde multiplicar-se em meio contendo antibióticos e quimioterápicos (AGOSTINHO, 1988).

RIBEIRO (1995) verificou a produção de peróxido de hidrogênio pelo *Lactobacillus* UFV H2b20 em concentrações suficientes para inibir tanto microrganismos patogênicos quanto deterioradores de alimentos.

NEUMANN et al. (1998) verificaram que *Lactobacillus* UFV H2b20, quando administrado a camundongos suíços livres de germes, estimula uma resposta imune não específica.

Por apresentar todas essas características, o *Lactobacillus* UFV H2b20 apresenta-se como um forte candidato a ser utilizado como probiótico (SANTOS, 1984; AGOSTINHO, 1988; RIBEIRO, 1995; NEUMANN et al., 1998).

A detecção e a identificação de espécies de bactérias do ácido láctico é importante para o controle da qualidade de produtos lácteos fermentados, na identificação *in situ* de linhagens probióticas e no monitoramento do processo de fermentação (TILSALA-TIMISJÄRVI et al., 1997). Porém, a identificação dessas bactérias por métodos fenotípicos é difícil devido à semelhança em requerimentos nutricionais e às suas características de crescimento. Os métodos fenotípicos para a determinação das espécies de lactobacilos são muitas vezes demorados e podem gerar resultados ambíguos. Por esse motivo, VANDAMME et al. (1996) propuseram a utilização da taxonomia polifásica para a identificação e caracterização de microrganismos. Esse termo foi criado por Colwell há mais de trinta anos e tem por objetivo a integração de diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genotípicas e filogenéticas) sobre os microrganismos. A informação genética é derivada dos ácidos nucleicos presentes na célula, enquanto a informação fenotípica é derivada de proteínas e suas funções, diferentes marcadores quimiotaxonômicos e uma ampla variedade de outras características que são expressas (VANDAMME et al., 1996).

As técnicas moleculares que têm sido utilizadas na identificação de *Lactobacillus* são hibridização DNA/DNA (MITEVA et al., 1992 e RODTONG e TANNOCK, 1993), amplificação de rDNA 16S com *primers* específicos (DRAKE et al., 1996, TILSALA-TIMISJÄRVI et al., 1997, SONG et al., 2000 e HEILIG et al., 2002), amplificação e análise de restrição de rDNA 16S

(STAHL et al., 1990, RODTONG e TANNOCK, 1993, KLEIN et al., 1998 e ANDRIGHETTO et al., 1998), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (COCCONCELLI et al., 1995 e TORRIANI et al., 1999), perfil de plasmídeos (ZHONG et al., 1998) e seqüenciamento de rDNA 16S (COLLINS et al., 1991).

Os genes de RNA ribossomal têm sido utilizados como ferramenta molecular para identificação e análise filogenética de bactérias (SONG et al., 2000) devido à antigüidade dos mecanismos de síntese protéica. Os rRNAs são moléculas funcionalmente constantes, distribuídas universalmente e apresentam seqüências moderadamente bem conservadas ao longo de distâncias filogenéticas. Logo, o grau de similaridade entre seqüências de rRNA de dois organismos indica sua relação evolucionária (WOESE et al., 1994 e MADIGAN et al., 2000).

NEVES (1998) amplificou a região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus* UFV H2b20 por meio de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando *primers* com homologia nas regiões conservadas nas extremidades do gene. O produto, um fragmento de 1,5 kb, foi tratado com várias endonucleases de restrição. Os resultados obtidos com a clivagem, bem como a análise de hibridização de Southern utilizando como sondas os *primers* de PCR e o segmento de DNA amplificado, sustentaram a hipótese de cópias polimórficas do gene.

UETANABARO (1999) amplificou, clonou e seqüenciou a região codificadora do gene de rRNA 16S do *Lactobacillus* UFV H2b20. O seqüenciamento de 1519 pb do rDNA 16S do H2b20 apresentou maior homologia (98 a 99%) com as seqüências de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, 98% com *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e de 92 a 93% com as seqüências de *Lactobacillus acidophilus*. Estes resultados levantaram dúvida sobre a classificação original do isolado que passou a ser denominado *Lactobacillus* UFV H2b20.

NEVES (2003) determinou, por hibridização DNA/DNA, que o H2b20 tem, aproximadamente, 70% de homologia com *L. delbrueckii*, confirmando os dados de UETANABARO (1999). Ainda não foi possível determinar a qual

das subespécies (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ele pertence, ou se pode ser caracterizado como uma nova subespécie. Desde então, esse isolado passou a ser denominado *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

Outra técnica molecular que vem sendo utilizada é DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) para analisar a diversidade genética de populações microbianas complexas. Esta técnica é baseada na separação de fragmentos de genes que codificam o rRNA 16S, gerados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante que aumenta linearmente. DGGE pode também ser aplicada para diagnosticar a presença e a abundância relativa de microrganismos tais como bactérias, leveduras e fungos em amostras obtidas de pacientes sofrendo de infecções combinadas (MUYZER et al., 1993).

MUYZER et al. (1993) explicam que a separação dos fragmentos na técnica de DGGE é baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA, parcialmente desnaturada, em géis de poliacrilamida. A desnaturação dos fragmentos resulta em *melting domains* (domínios de desnaturação). Quando se atinge o *melting domain* em uma posição particular do gel de DGGE, há uma transição de moléculas em hélice e moléculas parcialmente desnaturadas, quando a migração praticamente cessa. Variações nas seqüências de tais domínios causam diferenças nos domínios de desnaturação.

Para que ocorra uma resolução ótima dos fragmentos no gradiente desnaturante, há necessidade da incorporação de um grampo rico em bases GC (guanina e citosina) de aproximadamente 40 pb em um dos *primers*. A intensidade de cada banda e a sua posição no gel provavelmente representa a abundância relativa de uma espécie particular na população (MUYZER et al., 1993).

MUYZER e colaboradores (1993) demonstraram pela técnica de DGGE que é possível detectar microrganismos que estão representados com menos de 1% na população total.

Elementos transponíveis têm sido utilizados como ferramentas moleculares no estudo de sistemas de transposição *in vitro* tanto em eucariotos quanto em procariotos (MAHILLON e CHANDLER, 1998).

HAAPA et al. (1999) descreveram uma metodologia baseada na reação de transposição do DNA do bacteriófago Mu para aplicação em biologia molecular e análise genética funcional. O processo utiliza uma reação *in vitro* bastante eficiente e precisa com uma distribuição relativamente igual de sítios alvos. A metodologia é versátil com potencial uso em várias áreas de genética molecular, incluindo, além das aplicações tradicionais da transposição, novas abordagens para análise de genes, genomas e proteínas.

GRIFFIN et al. (1999) descreveram a eficiência e a ação ao acaso da reação de inserção do Tn552. Eles também demonstraram que o uso do Tn552 em um projeto de seqüenciamento de DNA em cosmídeos pode eliminar todas as etapas posteriores à subclonagem, o que resulta em uma redução significativa tanto de esforço quanto de custos.

A crescente disponibilidade de seqüências completas de genomas tem aumentado a demanda por ferramentas efetivas que gerem mutações insercionais em bactérias do ácido láctico, que são vistas como modelos para estudos genéticos e fisiológicos, particularmente para bactérias Gram positivas. Embora estratégias genéticas nesse grupo de microrganismos sejam muitas vezes problemáticas, várias metodologias de mutagêneses têm surgido. Mutagêneses baseadas em *shuttle*, *transposome* e *intron* oferecem alternativas para examinar o comportamento genético em muitas bactérias do ácido láctico. O conhecimento obtido a partir de tais abordagens será essencial para o futuro da genômica. Além disso, essas estratégias ajudarão a definir o impacto de bactérias do ácido láctico probióticas sobre o trato gastrointestinal e a saúde humana. Isso permitiria o desenvolvimento futuro de linhagens probióticas com novas propriedades promotoras de saúde (MILLS, 2001).

No presente trabalho estudou-se a filogenia e o rDNA do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 com o objetivo de ajudar a esclarecer sua identidade

e também indicar métodos para sua identificação entre outros isolados. Realizou-se a técnica de DGGE para obter o perfil de bandas desse isolado com o objetivo de distingui-lo dos demais *Lactobacillus* e caracterizou-se uma seqüência de inserção putativa, com seus componentes estruturais e regiões regulatórias.

CAPÍTULO 1

ANÁLISE DE rDNA DE *Lactobacillus* UFV H2b20

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante não apenas acelerou o progresso da pesquisa fundamental, como também abriu amplos caminhos para a produção de células e organismos para as indústrias de fermentação e farmacêutica. Além disso, as facilidades do seqüenciamento automatizado do DNA e o avanço de *softwares* que convertem seqüências de nucleotídeos a ORFs (*Open Reading Frames*) e ligam seqüências de nucleotídeos formando *contigs* têm permitido que genomas bacterianos inteiros sejam seqüenciados. Como muitos genomas estão sendo seqüenciados, espera-se entender com muito mais detalhes como a evolução direcionou a formação dos genomas dos organismos de hoje (VENEMMA et al., 1999).

PACE (1996) relata, dentre as várias utilidades do seqüenciamento de genes do rRNA, a possibilidade de inferência de propriedades de organismos de difícil cultivo em laboratório, a atribuição de características a microrganismos relacionados a partir de análise filogenética, a síntese de oligonucleotídeos para detecção do crescimento de um microrganismo específico em culturas mistas e a análise da biodiversidade em um ambiente de maneira rápida e completa pela obtenção de diferentes tipos de seqüências.

WOO et al. (2002) mostraram que o seqüenciamento do gene de rRNA 16S pode ser de grande valia na identificação de microrganismos em laboratório de microbiologia clínica, uma vez que pode-se prescrever o tempo de terapia com antibiótico específico de acordo com o microrganismo identificado.

O seqüenciamento do rDNA 16S em conjunto com a técnica de *riboprinting*, que é baseada na digestão do DNA cromossomal bacteriano com endonucleases de restrição seguida de hibridização por Southern com sondas para seqüências codificadoras dos genes 5S-23S-16S do operon de

rRNA de *Escherichia coli*, foi utilizado para identificar espécies de *Pediococcus* isoladas de cervejaria (BARNEY et al., 2001).

COLLINS et al. (1991), utilizando a estratégia de seqüenciamento por transcriptase reversa, descreveram que a diversidade filogenética entre as espécies de *Lactobacillus* estudadas foi evidente, tanto que dividiram-nas em três *clusters* distintos. *Cluster 1* (grupo *L. delbrueckii*) incluiu as espécies tipo do gênero e outras 11 espécies homofermentativas obrigatórias. O *cluster 2* (grupo *L. casei* / *Pediococcus*) foi o maior e filogeneticamente mais heterogêneo dos três grupos. Ele compreendeu 32 espécies de *Lactobacillus* e 5 espécies de *Pediococcus*. A maioria das espécies deste *cluster* eram heterofermentativas, embora algumas fossem obrigatoriamente homofermentativas (*L. animalis*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. sharpeae*, *L. yamanashiensis*). O *cluster 3* (grupo *Leuconostoc mesenteroides*) incluiu espécies de *Lactobacillus* heterofermentativas atípicas (*L. confusus*, *L. kandleri*, *L. minor*, *L. viridescens* e *Leuconostoc paramesenteroides*).

Genomas de algumas bactérias do ácido láctico estão sendo seqüenciados e as comparações entre a organização genética e o conteúdo informacional mostrarão as relações evolucionárias entre os diversos membros desse grupo. O estudo de genomas de bactérias do ácido láctico tem permitido a construção de sistemas de expressão de genes, de sistemas de integração de genes no cromossomo e de sistemas de defesa contra bacteriófagos. Além disso, as funções de ORFs e de unidades de transcrição têm sido identificadas e caracterizadas em detalhe, fornecendo aplicações práticas como lise induzida de bactérias do ácido láctico para aumentar a maturação de queijos e o redirecionamento do fluxo de carbono para a produção de um aminoácido específico (VENEMA et al., 1999).

Além disso, a comparação de vários genomas de espécies de bactérias do ácido láctico que estão sendo seqüenciados fornecerá uma visão crítica a respeito da adaptação microbiana, bem como dos eventos genéticos que levaram à sua adaptação em ambientes especializados. Outro resultado esperado da genômica comparativa de bactérias do ácido láctico será a definição de funções genéticas únicas, centrais e conservadas nesses

microrganismos como a produção de ácido láctico, atividades proteolítica e de peptidase, sobrevivência em pH baixo, tolerância a condições de estresse, produção de antimicrobianos, sistemas de transporte, sinalização celular e fixação/retenção em ambientes que mudam dinamicamente. Alguns desses genomas já foram completamente seqüenciados e análise comparativa tem mostrado que genes com funções essenciais são amplamente conservados entre essas bactérias e que comumente ocorre transferência horizontal de genes. Pode ser antecipado que as principais rotas através das quais ocorre essa transferência são os elementos IS, os bacteriófagos e os outros elementos genéticos móveis. As espécies de *Lactobacillus* que estão sendo seqüenciadas são *L. plantarum* WCFS1, *L. rhamnosus* HN001, *L. johnsonii* La1 (NCC2761), *L. acidophilus* ATCC 700393/NCFM, *L. gasseri* ATCC 33323 (neotype), *L. helveticus* CNRZ32, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC BAA-365, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. sakei* 23K, *L. casei* ATCC 334, *L. casei* BL23 e *L. brevis* ATCC 367 (KLAENHAMER et al., 2002)

NOUR (1998) analisou as seqüências das regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S e 23S-5S de *Lactobacillus* e propôs que os operons *rrn* compreendem os genes 16S, 23S e 5S, nessa ordem. A organização desses genes em operons poligênicos assegura a produção de quantidades equimolares das três espécies de rRNA. Foram encontradas pelo menos duas formas de organização dos operons *rrn*, uma com genes tRNA^{Ala} e tRNA^{Ile} em tandem e outra que não apresentava esses genes. Também observou que as divergências entre as seqüências das regiões espaçadoras surgem de inserções e deleções de pequenas seqüências.

O número de cópias do operon *rrn* pode variar de um, como em *Rickettsia prowazekii* e *Mycoplasma pneumoniae*, a quinze, como em *Clostridium paradoxum*, no genoma bacteriano. Múltiplas cópias de operons de rRNA em organismos procariotos são requeridas para alcançar uma alta taxa de crescimento (KLAPPENBACH et al., 2000).

Um número mínimo de cinco *loci rrn* foi encontrado em *Lactobacillus plantarum* por meio de amplificação, clonagem e seqüenciamento do rDNA

5S que foi utilizado como sonda para caracterizar linhagens desse microrganismo (CHEVALLIER et al., 1994).

Três métodos diferentes, perfil de proteína celular total, *fingerprinting* de DNA combinada com eletroforese em gel de campo pulsado e análise de genes de rDNA, foram utilizados em conjunto para determinar o número e a forma dos operons *rrn* em *L. delbrueckii* e suas subespécies. A ribotipagem foi realizada com as endonucleases *HindIII* e *EcoRI*. Os perfis de hibridização gerados pelos fragmentos de *HindIII* mostraram que pelo menos seis operons *rrn* estavam presentes em *L. delbrueckii* e suas subespécies. De acordo com os perfis de hibridização dos fragmentos de *EcoRI*, havia duas formas desses operons em *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, enquanto quatro formas estavam presentes em *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Por este perfil também foi possível concluir que havia duas classes de espaçadoras nos microrganismos analisados (MOSCHETTI et al., 1997).

Outro método molecular baseado no rDNA, PCR-DGGE foi usado para descrever a diversidade bacteriana durante a fermentação natural de salames italianos. A região V1 do gene rDNA 16S foi amplificada e submetida a eletroforese com gradiente de desnaturação. Os resultados indicaram que bactérias do ácido láctico estavam presentes com outros organismos, principalmente membros da família *Micrococcaceae* e contaminantes de carnes tais como *Brochothrix thermosphacta* e *Enterococcus* sp., durante os três primeiros dias da fermentação. Depois desse período, as bactérias do ácido láctico representavam a principal população responsável pela acidificação e pela proteólise que determina o perfil organoléptico de salames fermentados do tipo *Friuli Venezia Giulia* (COCOLIN et al., 2001).

Fragmentos de DNA, obtidos por PCR da região V2-V3 do gene rDNA 16S foram usados com o objetivo de detectar por DGGE a presença de espécies de *Lactobacillus* na microbiota estomacal de ratos que deveriam ser isentos de *Lactobacillus*. Também foi demonstrado que isolados de *Lactobacillus* cultivados a partir de amostras do trato gastrointestinal de

homens e suínos puderam ser identificados ou, pelo menos agrupados, pela mesma técnica (WALTER et al., 2000).

A técnica de PCR, utilizando *primers* específicos para gênero, combinada com DGGE permitiu a análise de comunidades de *Bifidobacterium* em fezes de indivíduos adultos. Este método também revelou a heterogeneidade intragenômica do rDNA 16S em *Bifidobacterium adolescentis* E-981074 que mostrou ter, pelo menos, cinco cópias distintas do rDNA 16S. Isto demonstra que a combinação de PCR gênero ou grupo específico com DGGE é uma ferramenta útil para o estudo de populações microbianas alvo do ecossistema complexo do trato gastrointestinal e abre novas possibilidades para que se possa acompanhar mudanças qualitativas das populações de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em resposta à administração de probióticos ou prebióticos, bem como avaliar o efeito da idade, do perfil genético e de outros fatores sobre a composição e diversidade desses grupos bacterianos (SATOKARI et al., 2001).

Dez produtos probióticos, entre eles quatro produtos lácteos, um suco de fruta e cinco produtos desidratados congelados, foram submetidos a análise microbiana pelo uso de método não dependente de cultura que compreendeu três etapas. A primeira foi a extração de DNA bacteriano a partir do produto probiótico, a segunda envolveu a amplificação por PCR da região V3 do rDNA 16S e a última, a eletroforese dos fragmentos amplificados em gel de gradiente desnaturante (DGGE). A captura digital e o processamento do padrão de bandas geradas por DGGE permitiram a identificação direta dos fragmentos em nível de espécie. Este método, independente de cultura, foi realizado em menos de trinta horas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados da análise dependente de cultura, que envolveu a identificação dos isolados pelo perfil de proteínas, utilizando o método SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), e pôde-se verificar que a análise de DGGE foi muito mais sensível na detecção de linhagens microbianas em produtos probióticos de maneira rápida, confiável e com reprodutibilidade (TEMMERMAN et al., 2003). A técnica utilizada carrega consigo o problema

da heterogeneidade desse gene quando comunidades microbianas são avaliadas (DAHLLÖF et al., 2000).

Neste trabalho, procurou-se estudar a filogenia e o rDNA do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, utilizando o de seqüenciamento, com o objetivo de diferenciá-lo das demais subspécies de *L. delbrueckii* ou confirmá-lo como uma delas, uma vez que a identificação inequívoca desse microrganismo é de interesse para estudos da atividade probiótica *in vivo* e para sua detecção em produtos industriais. Foi feita comparação do perfil de DGGE de cultura pura de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 com o de culturas puras de outros *Lactobacillus*, onde se verificou o número de cópias diferentes do rDNA 16S do mesmo isolado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia Industrial e de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, localizado no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa. O seqüenciamento dos clones foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, BA.

2.1. Microrganismos

Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 foi isolado de material fecal de crianças recém nascidas alimentadas exclusivamente com leite materno, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (SANTOS, 1984). As células foram conservadas em caldo MRS e 20% de glicerol, a -80°C .

Foram utilizados para seqüenciamento quatro clones distintos do fago λ (Lambda GEM[®] - 11 / Promega) f27, f29, f33, f36 (NEVES, 2003), contendo insertos de 15 kb de DNA de *Lactobacillus* UFV H2b20 que apresentaram hibridização com rDNA 16S. Estes sofreram restrição parcial com *Sau3AI* e foram subclonados em *Escherichia coli* JM 109. O vetor de clonagem utilizado foi o plasmideo *pBluescript* clivado com *BamHI*. As células transformadas de *E. coli* JM 109 foram conservadas em caldo LB e 20% de glicerol, a -80°C .

Para a técnica de DGGE, além do *L. delbrueckii* UFV H2b20, foram utilizados *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Escherichia coli* ATCC 1175. As células desses microrganismos foram conservadas em caldo MRS e 20% de glicerol, a -80°C .

2.2. Purificação dos subclones

A purificação dos subclones foi realizada com o objetivo de obter culturas puras.

A triagem dos subclones foi feita utilizando-se como substrato cromogênico o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosideo (X-gal) (Sigma) e como indutor gratuito da expressão do *lacZ* o isopropiltio- β -D-galactosideo (IPTG) (Sigma), segundo SAMBROOK et al. (1989).

2.3. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no laboratório de Genética e Biologia Molecular, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), BA. O seqüenciador utilizado foi MegaBase 1000 DNA Analysis System (Molecular Dynamics & Life Science) e a análise das seqüências obtidas foi realizada pelo programa Phred/Phrap, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Processo de seqüenciamento

A cultura de células foi reativada em placas de ELISA, sendo cada “pocinho” utilizado para um subclone diferente. O inóculo, feito em LB adicionado de 100 μ g / mL de ampicilina (Sigma), foi incubado a 37°C por 12-18 horas sob vigorosa agitação.

Após a obtenção da cultura de células, foi feita a extração de plasmídeos. A purificação foi realizada conforme informação do fabricante para extração de DNA plasmidial para seqüenciamento em ABI PRISMA 3100.

2.4. Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram analisadas no laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética, Instituto de Biologia da

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pelo programa de computador Phred/Phrap. Este programa realiza o alinhamento das seqüências de acordo com as sobreposições e retira as seqüências do vetor. Depois de alinhadas, essas seqüências foram organizadas em *contigs*. Maiores informações sobre o programa Phred/Phrap encontram-se disponíveis no site: <http://www.phrap.org>.

Os contigs obtidos foram analisados pelo programa Blast do NCBI (“National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que permite comparações com seqüências disponíveis nos bancos de dados, para a identificação dos diferentes genes do operon *rrn*. Também foi feita análise por programas que realizam alinhamento múltiplo de seqüências. Para esta análise foram utilizadas seqüências de rDNA 16S e de região espaçadora intergênica (16S-23S) de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de outros *Lactobacillus* do mesmo grupo, segundo classificação de COLLINS et al. (1991) e VANDAMME et al. (1996) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação de *Lactobacillus*. Grupo *L. Delbrueckii*.

Homofermentativos obrigatórios (Grupo A)	Heterofermentativos facultativos (Grupo B)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. jensenii</i> <i>L. amylophilus</i> <i>L. kefiranofaciens</i> <i>L. kefirgranum</i>	<i>L. acetotolerans</i> <i>L. hamsteri</i>

2.5. Extração de DNA total

Preparo das células

As células congeladas foram reativadas em leite desnatado 10% (Molico, Nestlé), incubadas a 37°C até que ocorresse a coagulação do mesmo. Foram, então, repicadas para 20 mL de caldo MRS 2% de glicose e incubadas a 37°C por 10 horas. Transcorrido o período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação em microtubos a 5000g (Microcentrifuge®-12 Beckman). O sedimento era lavado duas vezes com solução de tris-HCl 20mM, pH 8,0 e congelado para posterior extração de DNA.

Extração de DNA

As células congeladas foram ressuspensas em 800µL de TE (100mM TRIS-HCl pH 8,0 e 1mM EDTA), pH 8,0, em microtubos. Foram adicionadas lisozima (Sigma) e mutanolisina (Sigma) nas concentrações finais de 40µg/mL e 2µg/mL, respectivamente (MORAES, 1995). Os microtubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora.

Após a incubação, foi realizada centrifugação a 5000g por 10 minutos (Microcentrifuge®-12 Beckman). Os protoplastos foram ressuspensos em 800µL de TE (100mM Tris-HCl pH 8,0 e 1mM EDTA). Foram adicionados 200µL de SDS (duodecil sulfato de sódio) 10% e os microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C por 15 minutos para que houvesse lise celular.

RNAse A (Sigma) foi adicionada a uma concentração final de 50µg/mL. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

Adicionou-se também proteinase K a uma concentração final de 100µg/mL. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C por 15 minutos.

O volume foi dividido para dois microtubos e, em seguida, foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio pH 8,0. O conteúdo foi

cuidadosamente homogeneizado e a solução aquosa separada por centrifugação (Microcentrifuge[®]-12 Beckman). Com uma ponteira, cuja ponta era cortada, a fase aquosa foi coletada e transferida para um outro microtubo. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

Foi acrescentado à solução 1/10 do volume de acetato de sódio pH 5,2 e o DNA foi precipitado com igual volume de isopropanol. Depois foi feita centrifugação a 12000g (Microcentrifuge[®]-12 Beckman), lavagem do DNA com etanol 70% e secagem do mesmo à temperatura ambiente. O sedimento foi, então, ressuscitado em 20 μ L de TE pH 8,0 e conservado a 4°C até a utilização.

Quantificação e eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose 1,0%, em tampão TAE (0,04M Tris acetato e 0,001M EDTA), preparado de acordo com SAMBROOK et al. (1989).

A quantificação foi feita utilizando marcadores de quantidade de DNA de fago λ nas concentrações de 20ng/ μ L, 50ng/ μ L e 100ng/ μ L.

Alíquotas de 1 μ L de DNA foram acrescidas de corante (0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 15% de ficol) para serem aplicadas no gel, que foi submetido a eletroforese por 2 horas.

Depois de transcorrido o tempo da eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e as bandas de DNA foram visualizadas no sistema de digitalização de imagem Eagleeye[™] (Stratagene).

2.6. Amplificação de fragmento de rDNA 16S de *Lactobacillus* para análise de DGGE.

Um fragmento do gene codificador do rRNA 16S de *Lactobacillus* foi amplificado por PCR. O molde utilizado para as reações de amplificação foi o DNA total de cada microrganismo.

Primers

Foi utilizado o *primer* (INVITROGEN) da região conservada de rRNA 16S que corresponde à posição 341 no rDNA 16S de *E. coli*, contendo um grampo CG em sua extremidade para facilitar a resolução das bandas no gel.

O outro *primer* (GIBCO-BRL) corresponde à seqüência de assinatura de *Lactobacillus* se encontra, aproximadamente, na posição 833 do rDNA 16S.

A seqüência de nucleotídeos dos *primers* é:

CG Clamp: 5' – CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACG
GGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG -3'

Seqüência de assinatura: 5' – CGCTAGGTGTTGGGGAC – 3'

Reação de amplificação

A mistura de reação continha tampão da enzima Taq - polimerase (Promega), MgCl₂ (Promega), deoxirribonucleotídeos (dNTPs) (Promega), 20pmoles de cada *primer*, 1 unidade de Taq – polimerase (Promega) e 20 ng de cada DNA-molde.

As amplificações foram feitas no termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.). O programa foi composto de 15 ciclos:

Temperatura de desnaturação: 92°C por 1 minuto.

Temperatura de anelamento: 68°C por 45 segundos.

Temperatura de alongamento: 72°C por 45 segundos.

A cada ciclo, a temperatura de anelamento abaixou 1°C até atingir 53°C. Neste ponto, foram realizados mais 25 ciclos com os seguintes parâmetros:

Temperatura de desnaturação: 92°C por 1 minuto.

Temperatura de anelamento: 53°C por 45 segundos.

Temperatura de alongamento: 72°C por 45 segundos.

Foram analisados 10 μ L do produto da amplificação por eletroforese em gel de agarose conforme descrito na quantificação de DNA total, porém, foi utilizado o marcador de tamanho ϕ X174/*Hae* III.

2.7. PCR – DGGE

A análise de DGGE dos fragmentos amplificados por PCR foi realizada de acordo com MUYZER et al. (1993), utilizando o sistema DCode (Bio-Rad, Hercules, Califórnia).

O gel de poliacrilamida utilizado foi 6% (p/v) acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) em Tampão TAE 1,0X (Tris acetato e EDTA) com um gradiente linear de desnaturantes de 40 a 65%. Um desnaturante a 100% corresponde a 7 M de uréia e 40% (v/v) de formamida. O gel foi preparado segundo instruções do fabricante.

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados por eletroforese a uma voltagem constante de 150 V e uma temperatura de 60°C por 4 horas e 30 minutos. Transcorrido o tempo da eletroforese, o gel foi corado com SYBER GREEN e visualizado no sistema de digitalização de imagem Eagleeye™ (Stratagene).

3. Resultados e discussão

3.1. Seqüenciamento dos subclones

Foram purificados cerca de 200 subclones de cada fago recombinante (f27, f29, f33, f36). O número obtido de subclones estava de acordo com o estimado, tendo em vista o tamanho médio dos fragmentos que se inseriram no plasmídeo *pBluescript*, 1,5 Kb, e o tamanho do inserto que continha os genes do operon *rrn* e os braços do vetor lambda, 50 Kb.

Utilizando-se o *primer forward* foram obtidas 800 seqüências para os subclones dos quatro fagos recombinantes. Duzentas seqüências, utilizando o *primer reverse*, foram obtidas para os subclones originados de f36. O tamanho médio de cada seqüência era de 800 pares de bases.

De acordo com a estratégia de subclonagem utilizada por NEVES (2003), o resultado foi coerente, pois 30% das seqüências mostraram-se produtivas.

3.2. Análise do conteúdo C + G

As mil seqüências obtidas foram analisadas e alinhadas pelo programa Phred/Phrap (<http://www.phrap.org>) e produziram 50 *contigs* sem DNA do vetor.

Os 50 *contigs* obtidos foram agrupados em um único, resultando num total de 35961 pb e submetidos à análise do conteúdo C + G no programa DNAMAN (cedido como cortesia por Lynnon BioSoft). Foi encontrado um conteúdo C + G de 48%, resultado coerente com a definição de bactérias do ácido láctico (C + G < 55%) segundo KANDLER e WEISS, 1986. A mesma proporção foi encontrada para cada gene do operon *rrn*.

Os mesmos autores relatam que o gênero *Lactobacillus* possui, uma faixa de conteúdo C + G de 32 a 53% e que *Lactobacillus delbrueckii* possui 50% de C + G em seu DNA. Deve-se levar em conta que as seqüências são

provenientes de uma mesma região do cromossomo, não podendo representar o conteúdo C + G do genoma total.

3.3. Filogenia e rDNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

Para identificar os genes do RNA ribossomal, cada *contig* foi submetido à comparação com seqüências presentes no banco de dados utilizando o programa BLAST (National Computational Biology Project – NCBI). As seqüências apresentaram homologia com seqüências correspondentes de *L.delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L.delbrueckii* subsp. *lactis* e *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Dez *contigs* apresentaram homologia com rDNA 16S de *Lactobacillus delbrueckii* e suas três subespécies de acordo com a análise pelo programa BLAST. O *contig* 50 foi escolhido para análise filogenética baseada no rDNA 16S de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, pois era de maior tamanho e continha o gene 16S completo.

A partir do alinhamento múltiplo das seqüências de rDNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e dos outros membros do grupo *L. delbrueckii*, foi construída uma árvore filogenética (figura 1) para verificar o relacionamento filogenético entre ele e os demais.

O *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi agrupado com as subespécies de *L. delbrueckii*, apresentando maior proximidade genética com o *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (AY050172). A partir desse resultado, confirma-se que o *L. delbrueckii* UFV H2b20 possui características bastante peculiares, uma vez que o *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* não está associado à fermentação de leite e sim a fontes vegetais (GERMOND et al., 2003). Também apresenta coerência com a classificação de NEVES (2003), que utilizou a técnica de hibridização DNA-DNA para a caracterização de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Como esperado, *E. coli* (15) foi agrupada em um ramo separado na árvore filogenética, uma vez que pertence a outro grupo das eubactérias.

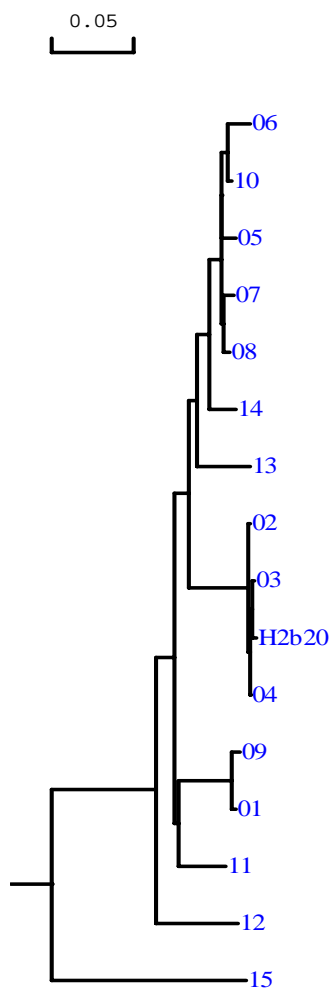


Figura 1 – Árvore filogenética do Grupo *Lactobacillus delbrueckii*, tendo como base de comparação as seqüências do rDNA 16S, mostrando a inserção do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 entre as subespécies de *L. delbrueckii*. *Escherichia coli* foi incluída para fins de comparação. Os números à direita representam:

- 01 – *L. gasseri* ATCC 33323 (AF519171)*
- 02 – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (AY050171)*
- 03 – *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649 (AY050172)*
- 04 – *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315 (AY050173)*
- 05 – *L. acidophilus* ATCC 4356 (M58802)*
- 06 – *L. gallinarum* ATCC 3319 (AJ242968)*
- 07 – *L. amylovorus* DSM 20531 (M58805)*
- 08 – *L. crispatus* DSM 20584 T (Y17362)*
- 09 – *L. johnsonii* ATCC 33200 (AJ002515)*
- 10 – *L. helveticus* NCDO 2712 (T) (X61141)*
- 11- *L. jensenii* ATCC25258 (AF243176)*
- 12 – *L. amylophilus* DSM 20533 (M58806)*
- 13 – *L. acetotolerans* DSM 20749 (M58801)*
- 14 – *L. hamsteri* DSM 5661T (AJ306298)*
- 15 – *E. coli* ATCC 25922 (X80724)*

* Código de acesso no GenBank.

O alinhamento múltiplo das seqüências de rDNA 16S das três subespécies de *L. delbrueckii* e do *L. delbrueckii* UFV H2b20 mostrou que elas possuem alto grau de similaridade. As diferenças entre elas são devidas a mutações pontuais como descrito por GERMOND et al. (2003) (tabela 2). Essas mutações são devidas à desaminação da 5-metilcitosina que leva à formação da base timina. Se o pareamento errado resultante escapa ao reparo, ocorrerá uma mutação orientada, isto é, a conversão de uma citosina para timina que é uma transição GC/AT. Esse evento poderá levar à formação de sítios de restrição que não existiam (GERMOND et al., 2003).

Tabela 2 – Troca de nucleotídeos nas seqüências de rDNA 16S em posições de acordo com a seqüência de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (GenBank AY050173).

	22	23	74	83	428	686	855	1012	1161	1269	1303	1451	1502	1504	1505
01	A	C	T	N	C	C	G	C	G	G	C	G	A	G	T
02	A	C	C	G	C	C	A	C	A	A	T	A	G	A	G
03	A	C	T	A	T	T	G	T	A	G	T	G	A	G	T
H2b20	C	T	C	G	C	C	G	C	G	A	C	A	A	G	T

01 – *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (AY050173)

02 – *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (AY050172)

03 - *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (AY050173)

De acordo com a análise no programa BLAST, também foram encontradas seqüências com homologia à região espaçadora 16S-23S de *L. delbrueckii* e suas subespécies. O *contig* 15 foi escolhido para análise detalhada de espaçadores, pois continha a seqüência completa. Foram coletadas no banco de dados seqüências de região espaçadora *Lactobacillus* pertencentes ao grupo *L. delbrueckii* de acordo com a classificação de COLLINS et al. (1991), VANDAMME et al. (1996) (tabela1). De acordo com o alinhamento múltiplo das seqüências da região espaçadora 16S-23S foi construída a árvore filogenética (figura 2).

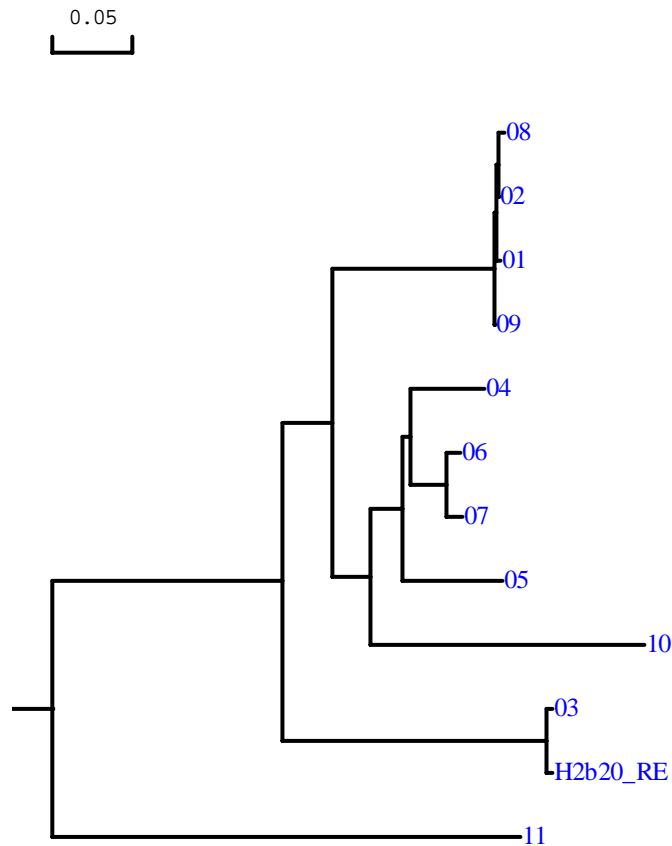


Figura 2 - Árvore filogenética do Grupo *Lactobacillus delbrueckii*, tendo como base de comparação as seqüências da região intergênica 16S-23S, mostrando a inserção do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 entre a subespécie de *L. delbrueckii*. *Listeria monocytogenes* foi incluída para fins de comparação. Os números à direita representam:

- 01 – *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797 (AB092635)*
- 02 – *L. acidophilus* ATCC 4356 (AB092634)*
- 03 – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (AF113602)*
- 04 – *L. helveticus* ATCC 15808 (U32970)*
- 05 – *L. hamsteri* ATCC 43851 (AF113601)*
- 06 – *L. amylovorus* JCM1126 (AF182732)*
- 07 – *L. crispatus* (AF074857)*
- 08 – *L. gasserii* ATCC33323 (AF074859)*
- 09 – *L. johnsonii* ATCC33200 (AF074860)*
- 10 – *L. jensenii* (AB035486)*
- 11 – *Listeria monocytogenes* ATCC 43248 (AF514308)*

* Código de acesso no GenBank

Tendo em vista a árvore filogenética obtida (figura 2), pode-se concluir que o *L. delbrueckii* UFV H2b20 agrupou com *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, porém deve-se considerar que no banco de dados não havia seqüência disponível da região espaçadora 16S-23S de *L. delbrueckii* subsp.

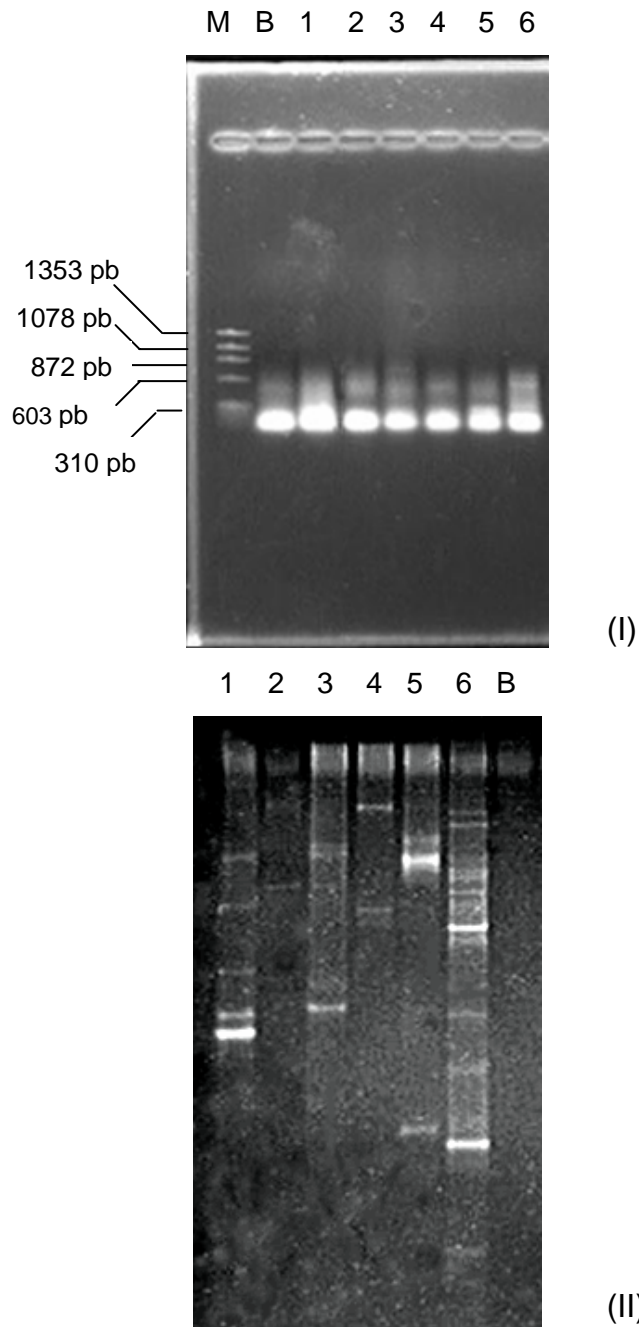
delbrueckii. A árvore baseada na região espaçadora 16S-23S pode mostrar resultados discrepantes da baseada no rDNA 16S, por ser a região espaçadora um sítio muito mais sujeito a variabilidade. Além disso, a existência de múltiplos operons *rrn* em *Lactobacillus* não foi considerada ao selecionar as seqüências. O seqüenciamento dos segmentos dos diferentes operons *rrn* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 demonstra a presença de diferentes seqüências intergênicas 16S-23S (dados não mostrados). As diferenças entre as figuras 1 e 2 podem ser atribuídas aos diferentes graus de conservação das seqüências que deram origem às duas árvores.

Comparações entre as seqüências dos genes 23S e 5S não foram realizadas porque poucas linhagens de *Lactobacillus* as possuem disponíveis no banco de dados.

Tendo em vista a relação de filogenia do isolado *L. delbrueckii* UFV H2b20 com os demais *Lactobacillus* do grupo *L. delbrueckii*, não devem existir dúvidas a respeito da sua classificação como *L. delbrueckii* (NEVES, 2003), que refutou a sua identificação como *L. acidophilus* (SANTOS, 1984). As evidências aqui demonstradas corroboram esta classificação.

3.4. Perfil de PCR-DGGE de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A técnica de PCR-DGGE foi realizada com um *primer* específico, para eubactérias, com grampo GC, e o outro com a seqüência de assinatura de *Lactobacillus* (UETANBARO, 1999). A banda obtida pela amplificação foi do tamanho desejado (figura 3I). Depois de verificada a presença do amplificado, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de gradiente desnaturante resultando na formação de várias bandas (figura 3II).



M - ϕ X 174/*Hae* III

1 - *L. delbrueckii* UFV H2b20

2 - *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC9649

3 - *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC12315

B - Branco

4 - *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC11842

5 - *L. acidophilus* ATCC4356

6 - *E. coli* ATCC1175

Figura 3 – (I) Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação por PCR do fragmento de rDNA 16S de *Lactobacillus*. (II) Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) do produto da amplificação por PCR do fragmento de rDNA 16S de *Lactobacillus*.

Com base na análise dos géis pode-se observar que o gel de gradiente desnaturante promove a discriminação de bandas que no gel de agarose se apresentam do mesmo tamanho. Essa separação de bandas é devido a diferenças na composição de bases e, conseqüentemente, a diferentes *melting domains* (MUYZER et al., 1993).

L. delbrueckii UFV H2b20 apresentou 5 bandas com diferentes domínios de desnaturação (canaleta 1). Pode-se inferir que cada banda representa uma cópia diferente do rDNA em cada operon *rrn*, confirmando dados de NEVES (1998) e UETANABARO (1999). A intensidade das bandas pode ser devida à presença de cópias idênticas de um mesmo operon *rrn*, o que confirma a observação de NEVES (2003) da presença de pelo menos 6 operons.

O isolado *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresenta um perfil de bandas diferente daquele das outras linhagens de *Lactobacillus*, o que poderá ser utilizado para diferenciá-lo das demais, uma vez que outros métodos baseados em PCR, como RAPD, mostraram-se pouco discriminatórios para bactérias do ácido láctico (BATISTA, 1997 e LIMA, 2002)

A técnica PCR-DGGE tem sido mais empregada na análise de comunidades microbianas. No entanto, aqui demonstrou-se sua utilização com resultados satisfatórios na análise de polimorfismos do operon *rrn* em microrganismos isolados. SATOKARI et al. (2001) relataram que este método revelou a heterogeneidade intragenômica do rDNA 16S em *Bifidobacterium adolescentis* E-981074 . Otimização da técnica com essa finalidade poderá trazer uma contribuição importante no estudo de seqüências repetidas no DNA de diferentes organismos.

CAPÍTULO 2

SEQÜÊNCIA DE INSERÇÃO PUTATIVA EM
***L. delbrueckii* UFV H2b20**

1. INTRODUÇÃO

Seqüências de inserção (IS) são pequenos segmentos de DNA que podem excisar e integrar-se em diferentes locais no genoma ou em plasmídeo (GERMOND et al., 1995). Podem existir em uma ou em múltiplas cópias e estão associadas a rearranjos genéticos como inserções, deleções, duplicações e inversões (MAHILLON e CHANDLER, 1998).

As ISs foram primeiramente detectadas em certas mutações no gene *lac* de *E. coli*. Essas mutações tinham a propriedade não característica de alta taxa de reversão para o tipo selvagem. Análises moleculares revelaram que essas mutações instáveis possuíam DNA extra no gene *lac* ou em suas proximidades. Quando o DNA dos revertentes para o tipo selvagem era comparado com o DNA dos mutantes era observado que um fragmento de DNA extra havia sido perdido. Deste modo, essas mutações geneticamente instáveis eram causadas por seqüências de DNA que tinham sido inseridas nos genes de *E. coli* e a reversão para o tipo selvagem era causada pela excisão dessas seqüências (SNUSTAD et al., 1997).

Estruturalmente, as seqüências de inserção possuem em média de 700 a 2500 pb e codificam, pelo menos, um polipeptídeo – uma transposase – envolvido no processo de transposição (GERMOND et al., 1995). Também possuem pequenas seqüências terminais invertidas (IR) entre 10 e 40 pb e são flanqueadas por repetições diretas (DR) de 2 a 13 nucleotídeos que representam uma duplicação no sítio alvo, geradas durante o evento de transposição (MAHILLON e CHANDLER, 1998).

As transposases são enzimas pertencentes à família das fosforiltransferases, com capacidade de ligar-se ao DNA (MAHILLON e CHANDLER, 1998). A análise da estrutura cristalina de algumas transposases revelou que elas possuem um motivo hélice – volta – hélice (*helix-turn-helix*), como a transposase Tc3, que facilita a ligação ao DNA. Revelou também que essas enzimas atuam na forma de dímeros (POUDEROYEN et al., 1997).

As transposases codificadas pelas ISs possuem um motivo característico DDE (ácido aspártico, ácido aspártico, ácido glutâmico) que está envolvido na catálise. Essa tríade de aminoácidos tem o papel presumido de coordenar cátions metálicos divalentes, como Mg^{2+} , que são incluídos na assistência a vários grupos de ataque nucleofílico durante o curso da reação. Em muitas famílias de ISs esse motivo é altamente conservado, juntamente com vários resíduos adicionais que incluem um resíduo K (lisina) ou R (arginina) aproximadamente a 7 aminoácidos além do resíduo E (ácido glutâmico) (MAHILLON e CHANDLER, 1998).

A seqüência de inserção ISL1 foi encontrada em *Lactobacillus casei*. Ela possui 1256 pb e contém, pelo menos, duas ORFs. Os componentes estruturais tais como seqüências terminais invertidas e repetições diretas no sítio alvo foram encontradas mostrando que realmente se tratava de um elemento transponível em *L. casei* (SHIMIZU-KADOTA et al., 1985).

Estudos genéticos também identificaram a presença dos elementos transponíveis ISS1, IS904 e IS981 no gênero *Lactococcus*, que inclui microrganismos importantes usados na produção de produtos lácteos fermentados. Em *Lactococcus*, seqüências de inserção estão associadas com o metabolismo da lactose e da sacarose, atividade da proteinase, produção de nisina e resistência a bacteriófagos, que são características significantes para o crescimento no leite (KLAENHAMMER et al., 1993).

Uma seqüência de inserção isolada de *Lactobacillus helveticus*, IS1201, possui uma ORF que codifica uma proteína de 369 aminoácidos. A IS1201 possui 24 pb em suas seqüências terminais invertidas e uma duplicação de 8pb no sítio alvo (repetição direta). Apresenta de 3 a 16 cópias no genoma de *L. helveticus* (TAILLIEZ et al., 1994).

GERMOND et al. (1995) descobriram e caracterizaram uma seqüência de inserção, ISL3, em *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, durante o estudo da relação entre dois genes importantes para a fermentação do leite, β -galactosidase (*lacZ*) e a protease associada à parede celular (*prtP*). A ISL3 é um elemento com 1494 pb, flanqueada por repetições terminais invertidas imperfeitas e gera duplicação de 8 pb no sítio alvo (repetições diretas)

durante o evento de transposição. Ela contém uma ORF que possivelmente codifica um potencial polipeptídeo de 434 aminoácidos, que apresenta homologia com a transposase de IS1165 de *Leuconostoc mesenteroides*. A ISL3 pode ser encontrada em uma ou em várias cópias e muitas linhagens de *L. delbrueckii*. Entretanto, não foi encontrada em outras bactérias do ácido láctico testadas.

A ISLdl1 foi isolada e caracterizada a partir de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 15808. Ela possui 1508 pb, é flanqueada por repetições terminais invertidas imperfeitas de 26 pb e gera um duplicação no sítio alvo de 8 pb rica em AT, durante a transposição. A ISLdl1 possui uma ORF que codifica uma proteína de 455 aminoácidos e está presente em cerca de 10 a 12 cópias no genoma de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 15808 (ALATOSSAVA et al., 2002).

Um grupo de seqüências de inserção, ISLdl2, ISLdl3 e ISLdl4 de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 15808 foi isolado, caracterizado e utilizado para identificação da linhagem, juntamente com a ISLdl1. A ISLdl2 possui 1367 pb, 24 pb de seqüências terminais invertidas e 8 pb de repetições diretas. Possui uma única ORF que codifica uma proteína de 392 aminoácidos, similar a transposases da família IS256. A ISLdl3 possui uma ORF que codifica uma proteína de 343 aminoácido, similar a transposases da família IS30, enquanto a ISLdl4 apresenta uma ORF que codifica uma proteína de 406 aminoácidos e demonstra homologia a transposases da família IS110 (ALATOSSAVA et al., 2003).

A importância da caracterização de seqüências de inserção em linhagens probióticas está relacionada à manutenção da estabilidade de suas características essenciais (BENGMARK, 1998). Além disso, podem vir a ser usadas no desenvolvimento de ferramentas para o estudo de funções específicas.

Neste trabalho, caracterizou-se uma seqüência de inserção putativa em *L. delbrueckii* UFV H2b20 com suas regiões reguladoras e componentes estruturais putativos com o objetivo que ela possa ser utilizada como

marcador para a identificação desse isolado em produtos industriais e para garantia de propriedade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 foi isolado de material fecal de crianças recém nascidas alimentadas exclusivamente com leite materno, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (SANTOS, 1984). As células foram conservadas em caldo MRS e 20% de glicerol, a -80°C .

Foram utilizados para seqüenciamento quatro clones distintos do fago λ (Lambda GEM[®] - 11 / Promega) f27, f29, f33, f36, contendo inserto de 15 kb de DNA de *Lactobacillus* UFV H2b20 que apresentaram hibridização com rDNA 16S. Estes sofreram restrição parcial com *Sau3AI* e foram subclonados em *Escherichia coli* JM 109 (NEVES, 2003). O vetor de clonagem utilizado foi o plasmídeo *pBluescript* clivado com *BamHI*. As células transformadas de *E. coli* JM 109 foram conservadas em caldo LB e 20% de glicerol, a -80°C .

2.2. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no laboratório de Genética e Biologia Molecular, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), BA. O seqüenciador utilizado foi MegaBase 1000 DNA Analysis System (Molecular Dynamics & Life Science) e a análise das seqüências obtidas foi realizada pelo programa Phred/Phrap, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Processo de seqüenciamento

A cultura de células foi reativada em placas de ELISA, sendo cada "pocinho" utilizado para um subclone diferente. O inóculo, feito em LB

adicionado de 100 µg / mL de ampicilina (Sigma), foi incubado a 37°C por 12-18 horas sob vigorosa agitação.

Após a obtenção da cultura de células, foi feita a extração de plasmídeos. A purificação foi realizada conforme informação do fabricante para extração de DNA plasmidial para seqüenciamento em ABI PRISMA 3100.

2.3. Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram analisadas no laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pelo programa de computador Phred/Phrap. Este programa realiza o alinhamento das seqüências de acordo com as sobreposições e retira as seqüências do vetor. Depois de alinhadas, essas seqüências foram organizadas em *contigs*. Maiores informações sobre o programa Phred/Phrap encontram-se disponíveis no site: <http://www.phrap.org>.

Os contigs obtidos foram analisados pelo programa Blast do NCBI (*“National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>*) que permite comparações com seqüências disponíveis nos bancos de dados, para a identificação dos genes do operon *rrn* e outros adjacentes a ele que também poderiam ter sido seqüenciados.

O programa DNAMAN (cedido como cortesia por Lynnon BioSoft) foi utilizado para identificar os componentes estruturais da seqüência de inserção putativa encontrada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise pelo programa BLAST mostrou 7 *contigs* com homologia a seqüências de inserção (IS) de *L. delbrueckii* e suas subespécies. Essas seqüências estavam adjacentes ao operon *rrn* tendo em vista a estratégia de clonagem utilizada por NEVES (2003). ISs também foram encontradas adjacentes a esse operon em *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (BOURGEOIS et al., 1995) e *Lactobacillus sakei* 23K (DUDEZ et al., 2002). Em um *contig*, a IS estava adjacente ao gene 16S e em outro ao gene 23S do operon *rrn*, possivelmente, interrompendo tais genes. O *contig* 49 foi escolhido para caracterização mais detalhada da seqüência de inserção putativa que foi denominada ISLdH2b20, de acordo com a nomenclatura sugerida por MAHILLON e CHANDLER (1998).

A ISLdH2b20 (figura 1), de 915 pb, possui uma ORF (*Open Reading Frame*) de 435 pb que codifica uma cadeia polipeptídica putativa de 145 aminoácidos que apresentou homologia à transposase de ISL5 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A seqüência de nucleotídeos da ISLdH2b20 apresentou 95% de homologia com a de ISL5 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* do nucleotídeo número 470 ao número 791. O restante da seqüência não apresentou homologia com a ISL5.

A ORF é flanqueada por uma seqüência repetida invertida imperfeita (IR) de 36 pb e uma seqüência direta repetida (DR) de 7 pb. Essas características também estão presentes em ISL3 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (GERMOND et al., 1995) e ISL1 de *Lactobacillus casei* (SHIMIZU-KADOTA et al., 1985). Em ISLdH2b20, a DR está separada por 7 pb da IR inicial da ORF.

Foram encontradas seqüências típicas de promotores de *Lactobacillus* com regiões análogas à região -35 (TTGAC) e -10 (TATAAT) separadas por 18 nucleotídeos que contêm um motivo TG antes do hexâmero -10 como relatado por McCRAKEN e TIMMS (1999) para *Lactobacillus*. Henki et al. (1987) e Voskuil et al. (1995 e 1998) citados por

McCRAKEN e TIMMS (1999) explicam que a presença do motivo TG parece ser de considerável importância nos microrganismos Gram positivos, onde a introdução ou deleção do motivo pode influenciar substancialmente a atividade do promotor.

Um sítio de ligação de ribossomos (RBS) (TCAAAC) foi encontrado próximo da região de início da tradução. A seqüência citada por GERMOND et al. (1995) é (AGAAAG). Acredita-se que essa diferença não comprometa a ligação do ribossomo. Foram encontrados *hairpins* próximos ao códon de parada que devem auxiliar na parada da transcrição.

1 TTTTTCTTGATAACT***TAGCTGA***TACCTTGGGGTTACCAATAAAGGGTTCATGTTGAAGTG
←
 61 CTGAAAGAGCAAAATGCTCAATAGCTTTCTTACTGATGGTAACT***TGACC***ATCAGACTTTT
-35
-10
 121 GATGAAGATATAATGACTGCGACCGTGGCCAAAAAAGTGTGATAATCAATAAAACAATTA
 181 ACACCGCCGCCAGAATTATCCCCTCCAAAAAAGGTATATTGGTTCGTA***CTGATCC***CAACC
RBS
 241 AATCAAACTTTAATTGC**ATG**GGTGTGCTAGTGCCAATGGCCGTTGACCAATTTTTAAAGA
M G V L V P M A V D Q F L K T
 301 CAAGAACTATGGACAAAGGAAATGCAAGGATAATAAAAACTACTATTAAAGCCTTGAATA
R T M D K G N A R I I K T T I K A L N I
 361 TAAATCTCATTTTCATCACCGCCTTTACCATCATTATAGCACGACAGGTAGTAAGAAACTA
N L I S S P P L P S L * H D R * * E T N
 421 ATTAGCAAGAAACTAATTTAAATAAAAACTAATTAGTTTTTTTTGACTAACTTAAACTTCC
* Q E T N * I K N * L V F L T N L N F P
 481 CACTTACAAAAGTGGGCTTGTACCTTGAAAATTCAATAGTTTAGCCAATAAAAAAGCACAA
L T K V G L Y L E N S I V * P I K K H K
 541 AGGCCTTTGTTTCGCTTGATAACTTTCAATCACTCCCTACAAATCCTGGTGGAAAGCCATGT
A F V R L I T F N H S L Q I L V E A M F
 601 TCGAGAGTCTGAAAGAAATCTTCCAACCGACAGAAGAGCAGATGGAAAGGTTACCAACG
E S L K E I F Q P T E E Q M E R F T N A
-----> ←-----
 661 CTTTCATTTAACGCCTCCCGAAGTACATGCAAGAGGCATTATCACCATCACTAGCAGCT**T**
F I * R L P K Y M Q E A L S P S L A A *
 721 **AA**TTGAATATTTACTGGCTAAACTATTGAGTTTTTCAAGGCTTAATGGTTCTTTTTGGTGT
 781 GGGAAAGTTTAAGGATTTTATTACAAACTGCCTGGCAAGTCGTCATTTTTTGGATCCCCAAG
 841 CTGGAGTAGCAGTAGTTTTCGCTGGCTTGGCACCAAGGGGATGGCTTTGACGCCGGGAACG
 901 TTTTCCACGGCAATATCCATCAAG***TAGCTGA***CGCCCATTCCTTGCCGAACTAATTGCAAG
▶
 961 GTAGCGTCAATATTGTGCGACGATCAGCTTTTTTGGTTGGTTGAAAACCAGTCTTAGCAAAG
 1021 AGCCGGTCAAGGGATGTTCTTTGATAAAAAAGCGCTTGTGCCGCATGATCGCGGGTTCAAA

Figura 1 – Sequência de nucleotídeos da ISLdH2b20. As repetições terminais invertidas estão sublinhadas por setas. Os 7 pb das repetições diretas são mostradas em negrito e itálico. A sequência de aminoácidos da ORF que codifica a transposase putativa está mostrada abaixo da sequência de nucleotídeos. O códon de início e de parada estão nas quadrículas. Sítio de ligação de ribossomo (RBS) putativo e as seqüências promotoras putativas estão sublinhados. Os *hairpins* são mostrados pelas setas tracejadas. Em cinza região de homologia com seqüência de nucleotídeos de ISL5 e região de homologia com aminoácidos da transposase de ISL5. * são códons de parada.

Tendo em vista a organização da ISLdH2b20, pode-se observar que a IR da porção final da seqüência se encontra afastada 167 nucleotídeos do códon de parada TAA que apresentou homologia com o mesmo códon da transposase de ISL5. Pode ser inferido que o polipeptídeo putativo codificado pela ISLdH2b20 possa continuar a ser traduzido até o próximo códon de parada da seqüência de nucleotídeos que está na posição 789, ocasionando um aumento no tamanho da ORF. Isso ocorreria se o códon TAA for resultado de erro no seqüenciamento.

A presença de códons de parada ao longo da seqüência traduzida às vezes é por erros de seqüenciamento (MAHILLON e CHANDLER, 1998). Há também que se considerar que esse polipeptídeo pode estar inativo, devido a presença desses códons de parada resultados de mutações. Ainda devem ser feitas outras análises para verificar a atividade dessa transposase e da IS.

Foi feita a análise dos códons preferencialmente usados na síntese da transposase (tabela 1) para ISLdH2b20, ISL5 e ISL1.

Tabela 1 – Códons preferencialmente utilizados para a síntese de transposases.

Aminoácido	Códon(s) mais usado(s) ISLdH2b20	Códon(s) mais usado(s) ISL5	Códon(s) mais usado(s) ISL1
Fenilalanina (F)	UUU (86%)	UUU (63%)	UUU (61%)
Leucina (L)	CUU (50%)	CUU (36%)	UUG (31%)
Isoleucina (I)	AUC e AUA (40%)	AUA (44%)	AUU (40%)
Valina (V)	GUU e GUG (50%)	GUU (55%)	GUA (37%)
Serina (S)	AGC (44%)	AGC (29%)	AGC (32%)
Prolina (P)	CCG (40%)	CCA (47%)	CCA (38%)
Treonina (T)	ACU (80%)	ACG (60%)	ACG (36%)
Alanina (A)	GCC e GCA (31%)	GCU (40%)	GCU (45%)
Tirosina (Y)	UAC (100%)	UAU (80%)	UAU (67%)
Histidina (H)	CAC (57%)	CAU (60%)	CAU (60%)
Glutamina (Q)	CAA (70%)	CAA (84%)	CAA (83%)
Asparagina (N)	AAC (60%)	AAU (86%)	AAC (54%)
Lisina (K)	AAA (67%)	AAA e AAG (50%)	AAA (73%)
Ac. Aspártico (D)	GAU (68%)	GAU (63%)	GAU (56%)
Glutâmico (E)	GAG (67%)	GAA (79%)	GAA (80%)
Cisteína (C)	UGU e UGC (50%)	UGC (60%)	UGC (75%)
Arginina (R)	CGA e AGA (25%)	AGA (30%)	CGU (26%)
Glicina (G)	GGA (54%)	GGU e GGA (36%)	GGU (57%)
Códon de parada	UGA (57%)	UGA (91%)	UGA (57%)

Pode-se observar que ocorre alguma semelhança na preferência de códon para os aminoácidos fenilalanina, serina, glutamina, lisina, ácido aspártico, cisteína e para o códon de parada nas três seqüências de inserção. Para os outros aminoácidos pode ocorrer igual preferência para duas ISs ou as preferências podem ser diferentes para ISLdH2b20, ISL5 e ISL1.

Para enquadrar a ISLdH2b20 nas famílias já descritas na literatura seqüências de nucleotídeos de transposases de tamanho próximo foram coletadas no banco de dados e alinhadas. Uma árvore de homologia (figura 2) foi construída para verificar a qual(is) família(s) a ISLdH2b20 era mais parecida. Não foram utilizadas seqüências de aminoácidos das transposases porque no alinhamento ocorrem códon de terminação e ou a presença de uma ou mais mudanças de *frame*, como previsto por MAHILLON e CHANDLER (1998).

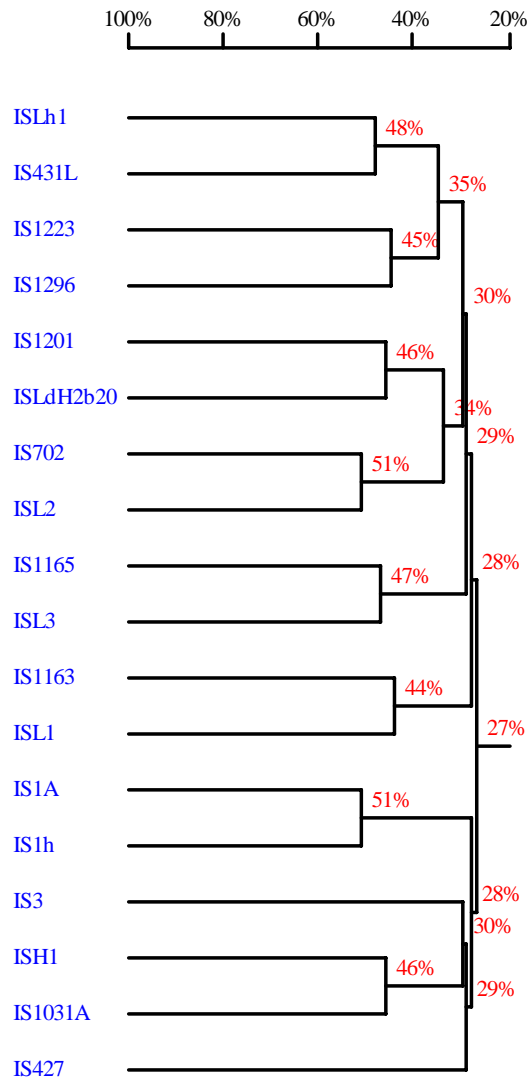


Figura 2 – Árvore de homologia tendo como base de comparação as seqüências de nucleotídeos de várias famílias de IS e a de ISLdH2b20. As siglas à esquerda representam IS dos microrganismos:

- | | |
|--|--|
| ISLh1 – <i>L. helveticus</i> ATCC15009 | IS1163 – <i>Pseudomonas fluorescens</i> ST |
| IS431L – <i>Staphylococcus aureus</i> | ISL1 – <i>L. casei</i> S-1 |
| IS1223 – <i>L. johnsonii</i> ATCC 11506 | IS1A – <i>E. coli</i> W3110 |
| IS1296 – <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> | IS1h – <i>E. coli</i> ECOR50 |
| IS1201 – <i>L. helveticus</i> CNRZ 1094 | IS3 – <i>E. coli</i> K-12 |
| IS702 – <i>Calothrix</i> sp. PCC7601 | ISH1 – <i>Halobacterium salinarium</i> S9 |
| ISL2 – <i>L. helveticus</i> LH28 | IS1031A – <i>Acetobacter xylinum</i> |
| IS1165 – <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> | IS427 – <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T37 |
| ISL3 – <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 | |

A ISLdH2b20 foi agrupada com IS1201 de *Lactobacillus helveticus* CNRZ1094, membro da família IS256 apresentando homologia de 46%. Quando analisadas outras características dessa família, foi observado que a ISLdH2b20 apresenta algumas diferenças da mesma como tamanho, apesar de muitas similaridades como IR, DR e ORF. Ainda deverá ser feita análise comparativa de cada componente estrutural da ISLdH2b20 com os componentes estruturais dos membros da família IS256 e também com a família IS5, visto que IS702 e ISL2 estão na mesma chave da árvore de homologia. Somente após essa análise a classificação será definitiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, S.M.M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2b20 sob condições do trato digestivo “in vitro” e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** Viçosa, MG: UFV 1988. 70p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- ALATOSSAVA, T., RAVIN, V. A new insertion sequence element, ISLdl1, in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 15808. **Microbiological Research**, v.157, p.109-114, 2002.
- ALATOSSAVA, T., RAVIN, V. Three new insertion sequence elements ISLd2, ISLd3 and ISLd4 in *Lactobacillus delbrueckii*: isolation, molecular characterization, and potencial use for strain identification. **Plasmid**, Article in press, 2003.
- ANDRIGHETTO, C., DE DEA, P., LOMBARDI, A., NEVIANI, E., ROSSETTI, L., GIRAFFA, G. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. **Research in Microbiology**, v.149, p.631-643, 1998.
- BARNEY, M., VOLGYI, A., NAVARRO, A., RYDER, D. Ribotyping and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.554-560, 2001.
- BATISTA, M.T. ***Lactobacillus* em culturas mistas para formulação de probiótico.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 41p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v.42, p.2-7, 1998.

- BOURGEOIS, P., LAUTIER, M., BERGHE, L., GASSON, M.J., RITZENTHALER, P. Physical and genetic map of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 reveals a large genome inversion. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.2840-2850, 1995.
- CHEVALLIER, B., HUBERT, J.C., KAMMERER, B. Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiology Letters**, v.120, p.51-56, 1994.
- COCCONCELLI, P.S., PORRO, D., GALANDINI, S., SENINI, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.376-379, 1995.
- COCOLIN, L., MANZANO, M., CANTONI, C., COMI, G. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of italian sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5113-5121, 2001.
- COLLINS, M.D., RODRIGUES, U., ASH, C., AGUIRRE, M., FARROW, J.A.E., MARTINEZ-MURCIA, A., PHILLIPS, B.A., WILLIAMS, A.M., WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v.77, p.5-12, 1991.
- DAHLLÖF, I., BAILLIE, H., KJELLEBERG, S. *rpoB*-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3376-3380, 2000.

- DRAKE, M., SMALI, C.L., SPENCE, K.D., SWANSON, B.G. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* ssp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.59, p.1031-1036, 1996.
- DUDEZ, A.M., CHAILLOU, S., HISSLER, L., STENTZ, R., VERGÈS, M.C.C., ALPERT, C.A., ZAGOREC, M. Physical and genetic map of *Lactobacillus sakei* 23K chromosome. **Journal of Microbiology**, v.148, p.421-431, 2002.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.
- GERMOND, J.E., LAPIERRE, L., DELLEY, M., MOLLET, P., FELIS, G.E., DELLAGLIO, F. Evolution of bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, p.93-104, 2003.
- GERMOND, J.E., LAPIERRE, L., DELLEY, M., MOLLET, B. A new mobile genetic element in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Molecular and General Genetic**, v.248, p.407-416, 1995.
- GRIFFIN, T.J., PARSONS, L., LESCHZINER, A.E., DeVOST, J., DERBYSHIRE, K.M., GRINDLEY, N.D.F. *In vitro* transposition of Tn552: a tool for DNA sequencing and mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.3859-3865, 1999.
- HAAPA, S., TAIRA, S., HEIKKINEN, E., SAVILAHTI, H. An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons *in vitro*: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.2777-2784, 1999.

- HAMMES, W.P., WEISS, N., HOLZAPFEL, W. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS, A., TRÜPER, H.G., DUORKIN, M., SCHLEIFER, K.-H. (Eds.). **The Procaryotes**, v.II. New York: Springer-Verlag, 1991. p.1535-1594.
- HEILIG, H.G.H.J., ZOETENDAL, E.G., VAUGHAN, E.E., MATEAU, P., AKKERMANS, A.D.L., VOS, W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* ssp. and other lactic acid bacteria in the intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.114-123, 2002.
- HENKI, T.M., SONENSHEIN, A.L. Mutations of the *Escherichia coli* lacUV5 promoter resulting in increased expression in *Bacillus subtilis*. **Molecular and General Genetic**, V.209, p.467-474, 1988.
- HOLZAPFEL, W.H., STILES, M.E. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.
- KADOTA, M.S., KIWAKI, M., HIROKAWA, H., TSUCHIDA, N. ISL1: A new transposable element in *Lactobacillus casei*. **Molecular and General Genetic**, v.200, p.193-198, 1985.
- KLAENHAMMER, T.R., ROMERO, D.A. Transposable elements in *Lactococci*: A Review. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1-19, 1993.
- KLAENHAMMER, R.T. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. **International Dairy Journal**, v.8, p.497-505, 1998.

KLAENHAMMER, T., ALTERMANN, E., ARIGONI, F., BOLOTIN, A., BREIDT, F., BROADBENT, J., CANO, R., CHAILLOU, S., DEUTSCHER, J., GASSON, M., VAN DE GUCHTE, M., GUZZO, J., HARTKE, A., HAWKINS, T., HOLS, P., HUTKINS, R., KLEEREBEZEM, M., KOK, J., KUIPERS, O., LUBBERS, M., MAGUIN, E., McKAY, L., MILLS, D., NAUTA, A., OVERBEEK, R., PEL, H., PRIDMORE, D., SAIER, M., SINDEREN, D., SOROKIN, A., STEELE, J., O'SULLIVAN, D., DE VOS, W., WEIMER, B., ZAGOREC, M., SIEZEN, R. Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.29-58, 2002.

KLAPPENBACH, J. A., DUNBAR, J.M., SCHMIDT, T.M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1328-1333, 2000.

KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., REUTER, G. Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.103-125, 1998.

KLIJN, N., WEERKAMP, A.H., VOS, W.M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.3390-3393, 1991.

LIMA, M.S. **Sucessão de bactérias do ácido láctico na fermentação de salame**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice – Hall, 2000.991p.

MAHILLON, J., CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.725-774, 1998.

- McCRACKEN, A., TIMMS, P. Efficiency of transcription from promoter sequence variants in *Lactobacillus* is both strain in context dependent. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.6569-6572, 1999.
- MILLS, D. A. Mutagenesis in the post genomics era: tools for generating insertional mutations in the lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p.503-509, 2001.
- MITEVA, V.I., ABADJIEVA, A.N., STEFANOVA, T.T. M13 DNA fingerprinting, a new tool for classification and identification of *Lactobacillus* ssp. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.349-354, 1992.
- MORAES, C.A. **The genetic relationship of D-xylose metabolism among the lactic acid bacteria.** Cornell: Cornell University, 1995. 143p. Tese (Doctor in Philosophy), Cornell University, 1995.
- MOSCHETTI, G., BLAIOTTA, G., APONTE, M., MAURIELLO, G., VILLANI, F., COPPOLA, S. Genotyping of *Lactobacillus delbrueckii* ssusp. *Bulgaricus* and determination of number and forms of *rrn* operons in *L. delbrueckii* and its subspecies. **Research in Microbiology**, v.148, p.501-510, 1997.
- MUYZER, G., DE WALL E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.
- NEUMANN, E., OLIVEIRA, M.A., CABRAL, C.M., MOURA, L.N., NICOLI, J.R., VIEIRA, E.C., CARA, D.C., PODOPRIGORA, G.I., Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1565-1573, 1998.

- NEVES, J.T.M. **Caracterização de região codificadora de RNA ribossomal 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 46p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- NEVES, J.T.M. **Características moleculares e identificação de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** Viçosa, MG: UFV, 2003. 151p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotid sequence, secondary structure and comparative analysis. **Research in Microbiology**, v.149, p.433-448, 1998.
- PACE, N.R., New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, v.62, p.463-470, 1996.
- POUDEROYEN, G., KETTING, R.F., PERRAKIS, A., PLASTERK, R.H.A., SIXMA, T.S. Cristal structure of the specific DNA-binding domain of Tc3 transposase of *C. elegans* in complex with transposon DNA. **The EMBO Journal**, v.16, p.6044-6054, 1997.
- RIBEIRO, M.A. **Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** Viçosa, MG: UFV, 1995. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- RODTONG, S., TANNOCK, G.W. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.3480-3484, 1993.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning. A Laboratory Manual.** 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.v. 1-3.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético.** Viçosa, MG: UFV, 1984. 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1984.

SATOKARI, R.M., VAUGHAN, E.E., AKKERMANS, A.D.L., SAARELA, M., DE VOS, W.M. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.504-507, 2001.

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.P., JEKINS, J.B. **Principles of Genetics.** John Wiley & Sons, Inc., 1997.829p.

SONG, Y., KATO, N., LIU, C., MATSUMIYA, Y., KATO, H., WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v.187, p.167-173, 2000.

STAHL, M., MOLIN, F., PERSSON, A., AHRNE, S., STAHL, S. Restriction endonucleases patterns and multivariate analysis as a classification tool for *Lactobacillus* ssp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p.189-193, 1990.

TAILLIEZ, P., EHRLICH, S.D., CHOPIN, A.C. Characterization of IS1201, an insertion sequence isolated from *Lactobacillus helveticus*. **Gene**, v.145, p.75-79, 1994.

- TEMMERMAN, R., SCHEIRLINCK, I., HUYS, G., SWINGS, J. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.220-226, 2003.
- TIMISJÄRVI-TILSALA, A., ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p. 49-56, 1997.
- TORRIANI, S., ZAPPAROLI, G., DELLAGLIO, F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4351-4356, 1999.
- UETANABARO, A.P.T. **Seqüência e caracterização de região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- VANDAMME, P., POT, B. GILLIS, M., VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.
- VAN DE GUCHTE, M., EHRLICH, D.S., MAGUIN, E. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.147-153, 2001.

- VENEMA, G., KOK, J., SINDEREN, D. From DNA sequence to application: possibilities and complications. In: KONINGS, W.N., KUIPERS, O.P., HUIS IN'T VELD, J.H.J. (Eds.) **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.3-23.
- VOSKUIL, M.L., VOEPEL, K., CHAMBLISS, G.H. The -16 region, a vital sequence for utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.17, p.271-279, 1995.
- VOSKUIL, M.L., CHAMBLISS, G.H. The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram positive bacterial promoters. **Nucleic Acids Research**. V.26, p.3384-3590, 1998.
- WALTER, J., TANNOCK, G.W., TILSALA-TIMISJÄRVI, A., RODTONG, S., LOACH, D.M., MUNRO, K., ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.297-303, 2000.
- WOESE, R.C., LARSEN, N., GUTELL, R.R. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S structures from a comparative perspective. **Microbiological Reviews**, v.58, p.10-26, 1994.
- WOO, P.C.Y., FUNG, A.M.Y., LAU, S.K.P., YUEN, K-Y. Identification by 16S rRNA gene sequencing of *Lactobacillus salivarius* bacteremic cholecystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.265-267, 2002.
- ZHONG, W., MILLSAP, K., BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H., REID, G. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2418-2423, 1998.