

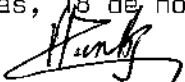
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Caracterização Molecular de Linhagens de *Lactobacillus
fermentum***

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por SUSY FERNANDES VARIANE e aprovada pela Comissão Julgadora em 18.11.1996.

Campinas, 18 de novembro de 1996


PROF.DR.VANDERLEI PEREZ CANHOS

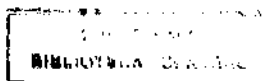
Presidente da Banca

Susy Fernandes Variane R.A.: 935329

**Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
Orientador**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção
de título de mestre em Ciência de Alimentos**

**Campinas
1996**



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: Unicamp
V426c
 V. Ex
 TUBO BC/ 29476
 PROC. 281/97
 C ☐ D ☒
 PREÇO 2811,00
 DATA 13/01/97
 N.º CPO

CM-00096570-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

V426c Variane, Susy Fernandes
 Caracterização molecular de linhagens de *Lactobacillus*
fermentum / Susy Fernandes Variane. -- Campinas, SP: [s.n.], 1996

Orientador : Vanderlei Perez Canhos
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

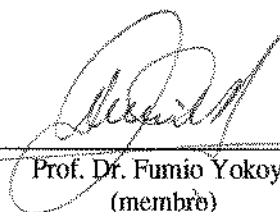
1. Taxonomia. 2. Lactobacilo. 3. Fermentação alcoólica.
 I. Canhos, Vanderlei Perez II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(orientador)

Prof. Dra. Hélia Harumi Sato
(membro)



Prof. Dr. Fumio Yokoya
(membro)



Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão
(membro)

Campinas, 18 de novembro de 1996.

Aos meus pais,
João e Alderiza
dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos pela orientação e pelo estímulo recebidos durante o mestrado.

Ao Heitor L. C. Coutinho pelo trabalho de co-orientação, incentivo e amizade.

Ao Gilson Paulo Manfio pela construção dos dendrogramas e amizade.

À Manuela da Silva pelo auxílio na elaboração do abstract e pela amizade.

À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" que proporcionou as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, pelo auxílio de seus pesquisadores e corpo técnico administrativo sempre solidários em todos os momentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À Cristina Y. Umino pelo trabalho de fotografia e pela amizade e carinho que sempre demonstrou.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência, companheirismo e auxílio mútuo.

Ao meu irmão João Variane Júnior, pela presença alegre e companheira durante esses anos.

Aos amigos da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" pela amizade verdadeira e presença constante durante os momentos de alegria e também nos momentos de dificuldade.

CONTEÚDO

CONTEÚDO	i
CONTEÚDO DAS TABELAS.....	iii
CONTEÚDO DAS FIGURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Taxonomia de <i>Lactobacillus</i>	3
2.1.1. Sistema API 50 CHL	4
2.1.2. Taxonomia numérica de <i>Lactobacillus</i>	5
2.2. Caracterização molecular de <i>Lactobacillus</i>	7
2.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP).....	8
2.2.2. Hibridização	8
2.2.3. Ribotipagem	9
2.2.4. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	11
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Linhagens bacterianas	14
3.2. Caracterização fenotípica.....	14
3.2.1. Inóculo das galerias de API 50 CHL	14
3.2.2. Análise numérica dos resultados de fermentação de carboidratos.....	15
3.3. RAPD	18
3.3.1. Extração de DNA.....	18
3.3.2. Estimativa da concentração de DNA.....	18
3.3.3. RAPD.....	19
3.3.4. Análise numérica dos padrões de RAPD	21

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Caracterização fenotípica.....	22
4.2. RAPD	27
4.3. Considerações finais	31
4.4. Figuras e tabelas	33
5 - CONCLUSÕES	45
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

CONTEÚDO DAS TABELAS

TABELA 1 - Alguns microrganismos analisados através da técnica de RAPD.....	13
TABELA 2 - Linhagens de <i>Lactobacillus</i> analisadas.....	16
TABELA 3 - Tampão T.E.B.	19
TABELA 4 - Mistura de reação de RAPD.....	20
TABELA 5 - Ciclos das reações de RAPD	20
TABELA 6 - Perfis de fermentação de carboidratos utilizando sistema API 50 CHL, de linhagens de <i>Lactobacillus</i>	35
TABELA 7 - Características dos “clusters” de <i>Lactobacillus</i>	37

CONTEÚDO DAS FIGURAS

FIGURA 1 - Inoculação no sistema API 50 CHL.....	15
FIGURA 2 - Sistema API 50 CHL inoculado com <i>Lactobacillus fermentum</i> ^T CCT 2571.....	34
FIGURA 3 - Dendrograma de linhagens de <i>Lactobacillus</i> de acordo com utilização de fontes de carbono usando sistema API 50 CHL	38
FIGURA 4 - Triagem de "primers" UBC 1-10 com DNA da linhagem.....	39
FIGURA 5 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD	40
FIGURA 6 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD	40
FIGURA 7 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD	41
FIGURA 8 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD	41
FIGURA 9 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD	42
FIGURA 10 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD	42
FIGURA 11 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD	43
FIGURA 12 - "Fingerprinting" de linhagens de <i>Lactobacillus</i> usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD	43
FIGURA 13 - Dendrograma de linhagens de <i>Lactobacillus</i> de acordo com técnica de RAPD usando "primers" UBC 2 e UBC 4.....	44

RESUMO

O gênero *Lactobacillus* é encontrado no trato intestinal de humanos saudáveis e animais, como também em vegetais fermentados, produtos cárneos, vinhos e cervejas. Por outro lado, é largamente utilizado na preparação de uma variedade de alimentos como culturas “starter” em queijos e outros laticínios (BOTTAZZI, 1988). Além disso, linhagens de *Lactobacillus*, têm sido isoladas como contaminantes em usinas de álcool.

O gênero *Lactobacillus* é o que contém o maior número de espécies de bactérias ácido-láticas; é também o mais heterogêneo compreendendo espécies com uma grande variedade de propriedades bioquímicas e fisiológicas. A heterogeneidade se reflete pela extensão do teor de mol% de G+C das espécies incluídas no gênero que é de 32-53 mol%.

Linhagens de *Lactobacillus fermentum*, isoladas de usinas de álcool do estado de São Paulo foram caracterizadas através de técnicas bioquímica e molecular, através dos perfis de fermentação de carboidratos e da técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). A partir da amplificação de fragmentos de DNA, utilizando-se “primers” arbitrários, foi possível gerar “fingerprintings” através da técnica de RAPD, capazes de discriminar entre linhagens da mesma espécie, permitindo o enquadramento em grupos distintos com características em comum.

Através da análise dos perfis de fermentação de carboidratos, observou-se a formação de grupos com características próprias e que foram os mesmos grupos obtidos através da técnica de RAPD, indicando portanto a existência de grupos bem definidos de linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus* que estão presentes como contaminantes de fermentação alcoólica.

ABSTRACT

The *Lactobacillus* genus is found mainly in the intestinal tract of healthy humans and animals, as well as in fermented vegetables, fleshy products, wines and beers. Nevertheless, it is largely used in several food preparations, for instance, as starter cultures for cheeses and other dairy products (BOTTAZZI, 1988). Strains of *Lactobacillus* genus have been isolated from alcohol industries.

The *Lactobacillus* genus is the biggest one in the lactic-acidic bacteria group; it is also the most heterogeneous group, which comprises species with a large variety of biochemical and physiological properties. The heterogeneity is due to the high G+C content of species from this genus, 32 to 53 mol%.

Lactobacillus fermentum strains isolated from alcohol industries from São Paulo State were characterized by biochemical and molecular techniques, such as carbohydrate fermentation profiles and RAPD technique (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Based on amplification of DNA fragments, using random primers, the RAPD technique provides fingerprintings, enabling to discriminate between strains from the same species, besides it allows the formation of different groups with the same characteristics.

Through analysis of carbohydrate fermentation profiles, it was possible to observe the formation of groups with their own features, which were the same group obtained through RAPD technique, showing, therefore, the existence of well defined groups of *Lactobacillus* strains which are present as alcoholic fermentation contaminants.

1.Introdução

A produção de álcool a partir de cana-de açúcar enfrenta sérios problemas em relação a contaminantes, pois a matéria prima leva consigo, para dentro da indústria uma grande quantidade de microrganismos que podem fazer parte de sua própria flora como podem estar presentes na terra aderida aos colmos, raízes e folhas. Canas saudáveis podem conter 10^1 a 10^8 bactérias/g e 10^1 a 10^3 fungos e leveduras/g (MAYEUX, 1960; DUNCAN & COLMER, 1964).

TILBURY (1968), estudou a biodeterioração da cana colhida e verificou o aumento da população microbiana, particularmente de lactobacilos, leveduras e bactérias acidófilas, em relação ao tempo de estocagem. Os microrganismos foram selecionados de acordo com sua capacidade de deterioração, sendo os lactobacilos os principais, embora algumas leveduras também tenham causado danos. A identificação de 80 lactobacilos, mostrou que as espécies predominantes foram *Lactobacillus plantarum* e *L. casei*, que juntamente com *Leuconostoc mesenteroides* se mostraram as bactérias mais frequentes após 10 dias de estocagem.

Um levantamento dos microrganismos na indústria alcooleira do estado de São Paulo, indicou vários gêneros microbianos como contaminantes de mosto e de dornas, encontrando os gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e bactérias Gram-negativas, sendo que 65% das espécies bacterianas isoladas eram do gênero *Lactobacillus*, e a espécie predominante era *Lactobacillus fermentum* (GALLO, 1989). A presença de microrganismos contaminantes em usinas de álcool é um fenômeno de grande importância econômica, sendo que são necessárias informações mais detalhadas a respeito de sua identificação.

A identificação em nível de espécie do gênero *Lactobacillus* em particular, é ainda fundamentada em caracteres fenotípicos e fisiológicos (AXELSSON, 1993). Algumas técnicas moleculares têm sido empregadas com o objetivo de se obter uma classificação

polifásica, e o que se tem encontrado é que há relação entre os dados obtidos por diferentes técnicas na identificação dos microorganismos estudados.

O objetivo do presente trabalho foi determinar características fenotípicas e moleculares de linhagens de *Lactobacillus fermentum* isoladas como contaminantes de fermentação alcoólica em usinas do estado de São Paulo, usando-se a técnica de RAPD, comparando-a aos seus perfis de fermentação de carboidratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia de *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é encontrado no trato intestinal de humanos saudáveis e animais, como também em vegetais fermentados, produtos cárneos, vinhos e cervejas. Por outro lado, é largamente utilizado na preparação de uma variedade de alimentos como culturas cultura iniciadora em queijos e outros laticínios (BOTTAZZI, 1988).

O principal papel dessas bactérias na tecnologia de alimentos, consiste na produção de ácido láctico o qual inibe o crescimento de contaminantes, e confere sabor agradável, além de ser facilmente metabolizado pelo corpo humano. Embora a fermentação láctica fosse utilizada pelo homem quando ele inventou a escrita, levou-se muitos anos até que Louis Pasteur reconheceu, em 1857 a natureza microbiana das fermentações lácticas (STACKEBRANDT & TEUBER, 1988).

O gênero *Lactobacillus* é o maior dos gêneros incluídos no grupo das bactérias ácido-lácticas; é também o mais heterogêneo compreendendo espécies com uma grande variedade de propriedades bioquímicas e fisiológicas. A heterogeneidade se reflete pela extensão do teor de mol% de G+C das espécies incluídas no gênero. Essa extensão é de 32-53 mol%, que é duas vezes a extensão comumente aceita para um único gênero (PRIEST & AUSTIN, 1993). A heterogeneidade e o grande número de espécies são devidas a definição deste gênero, que engloba basicamente qualquer bastonete ácido-láctico. Com base em caracteres fisiológicos os *Lactobacillus* foram subdivididos em três grupos, que são: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório.

O gênero *Lactobacillus* compreende mais de 50 espécies, e sua classificação é ainda fundamentada em caracteres fenotípicos e fisiológicos, como perfil de fermentação de carboidratos e crescimento a certas temperaturas (AXELSSON, 1993).

2.1.1. Sistema API 50 CHL.

Testes tradicionais de fermentação de carboidratos para *Lactobacillus*, consistem na verificação da produção de ácido e/ou gás, inoculando-se a linhagem a ser estudada num meio de cultura basal que pode ser líquido ou semi-sólido, contendo o carboidrato teste e um indicador de pH (JENSEN & EDWARDS, 1991). Recentemente, "kits" miniaturizados (como o sistema API 50 CHL), foram desenvolvidos e têm sido usados na identificação de linhagens de interesse (MACKEY *et alii*, 1993).

O sistema API 50 CH é um "kit" que compreende 49 diferentes carboidratos desidratados, distribuídas em galerias que são preenchidas com meio de inoculação apropriado para o microrganismo em estudo. É um sistema usado em biotipagem, taxonomia, identificação e pesquisa. O meio de inoculação é disponível para grupos específicos de microrganismos como enterobactérias, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bacillus* (ISON, 1987). Os resultados obtidos das leituras das galerias após 24-48 horas, dependendo do microrganismo ou do tipo de "kit", são comparados com uma tabela de identificação (LOGAN, 1994).

O sistema API 50 CHL (específico para *Lactobacillus*), tem sido amplamente utilizado na identificação de *Lactobacillus* de diversas origens como produtos cárneos, laticínios, vegetais e produtos de panificação (LEE & SIMARD, 1984).

A vantagem em se utilizar um "kit" como o API 50 CHL está no seu longo prazo de validade e na padronização de seu preparo, evitando-se assim discrepâncias nos resultados obtidos devidos ao preparo do meio basal (BAYA, 1991). Além disso, é simples e rápido de inocular, e oferece resultados confiáveis e reprodutíveis (LOGAN, 1994).

2.1.2. Taxonomia Numérica de *Lactobacillus*.

Taxonomia numérica foi aplicada para bactérias pela primeira vez nos anos 50 com o objetivo de classificar linhagens individuais em grupos homogêneos (espécies) com base em grande quantidade de tipos de dados diferentes; auxiliando na distribuição de espécies semelhantes em grupos superiores (gênero, família); e usando os dados gerados para melhorar esquemas de identificação (SNEATH, 1985).

A classificação pela taxonomia numérica deve ser baseada em muitas características, uma vez que a similaridade pode ser irreal quando se utilizam poucos caracteres (SNEATH & SOKAL, 1973). Nesse ponto, difere da taxonomia clássica que elege poucas características consideradas importantes (PRIEST & AUSTIN, 1993).

A taxonomia numérica tornou-se um método de uso comum e de sucesso para classificação e identificação bacteriana. Apesar do valor e utilidade das técnicas numéricas, alguns grupos de bactérias não mereceram a devida atenção. Até dez anos atrás, existiam poucos estudos para *Lactobacillus*, que são bactérias economicamente importantes e amplamente distribuídas em laticínios, bebidas fermentadas, sendo também encontradas em associação com humanos, plantas e animais (PRIEST, 1985).

Através do emprego de taxonomia numérica e agrupamento de linhagens utilizando-se algoritmo, HAUSER & SMITH (1964) estudaram 59 linhagens de *Lactobacillus* isolados de queijo e 9 linhagens de referência, e obtiveram 5 grupos onde alguns isolados foram agrupados em nível de similaridade de 53% indicando heterogeneidade. BARRE *et alii* (1969), estudaram 65 linhagens isoladas de vinho onde a maioria das linhagens foi identificada como *L.buchneri*. LABAN *et alii* (1978), examinaram 190 linhagens isoladas de produtos cárneos, usando sistema API 50 CHL, e obtiveram grande número de linhagens que não puderam ser identificadas.

Mais recentemente, a taxonomia numérica foi empregada em vários estudos para identificar e agrupar *Lactobacillus* originários de várias fontes como alimentos e fermentação alcoólica, presentes como contaminantes de processos industriais (SHAW & HARDING, 1984; HASTINGS & HOLZAPFEL, 1987; GALLO, 1989; GRANT & PATTERSON, 1991; DYKES *et alii*, 1994a; GOBBETTI, *et alii*, 1994).

Devido a diversidade de espécies e variação fenotípica presente no gênero, inconsistências no sistema de classificação levaram a problemas na sistemática desse grupo. Referências a *Lactobacillus* "atípicos" foram indicativos de que ocorreram problemas e divergências entre o que foi descrito como típico na literatura e o que foi encontrado na prática (HASTINGS & HOLZAPFEL, 1987).

O emprego de métodos numéricos e agrupamento de linhagens no estudo taxonômico de *Lactobacillus*, esclareceu um pouco esse quadro, pois possibilitou a divisão dos *Lactobacillus* estudados em grupos bem definidos. Isso evita a necessidade do termo "atípico" que foi usado para descrever *Lactobacillus* não identificados com espécies descritas. O agrupamento permitiu a seleção de linhagens representativas para estudos, os quais levaram a um melhor entendimento do papel de diferentes tipos de *Lactobacillus* presentes como contaminantes (SHAW & HARDING, 1984).

Usando a estratégia de taxonomia numérica e agrupamento, GRANT & PATTERSON (1991), agruparam *Lactobacillus* contaminantes presentes em alimentos em nível de similaridade de 95%, sendo que essas linhagens estavam associadas com uma linhagem tipo em nível de similaridade de 83%. A maioria das linhagens de referência não foi agrupada com os isolados, embora linhagens de referência isoladas de diferentes tipos de alimentos tenham sido incluídas. Isso significa que a identidade de um certo número de linhagens permanece incerta; visto que esses *Lactobacillus* contaminantes presentes em alimentos possuem características próprias e formam um grupo em particular.

DYKES *et alii* (1994a), também encontraram *Lactobacillus* atípicos presentes como contaminantes em alimentos; e embora muitos métodos simplificados de identificação tenham sido desenvolvidos, encontrou linhagens que não se enquadraram em

nenhum grupo. Ainda que os isolados tenham sido agrupados em grupos bem definidos, poucas linhagens de referência foram agrupadas nesses grupos.

GOBBETTI *et alii* (1994), com o objetivo de selecionar culturas iniciadoras, agruparam espécies de *Lactobacillus* construindo grupos, e observaram que linhagens identificadas como espécies diferentes foram colocadas num mesmo grupo em nível de 91% de similaridade. Devido às semelhanças bioquímicas e fisiológicas entre as espécies, os autores sugeriram que estudos genéticos deveriam ser realizados para identificá-las.

Esses resultados indicaram a existência de grupos bem definidos de linhagens de *Lactobacillus* presentes numa variedade de substratos, os quais, para o caso de culturas cultura iniciadora, poderiam ser mais efetivos que linhagens originárias de laticínios (SANZ *et alii*, 1988), pois essas linhagens podem ser mais competitivas durante a fermentação e também podem produzir bacteriocinas que auxiliariam na preservação dos alimentos (SAMELIS *et alii*, 1994).

2.2. Caracterização Molecular de *Lactobacillus*.

Apesar da identificação de *Lactobacillus* ser baseada em características morfo-fisiológicas, como dito anteriormente, é comum surgirem problemas técnicos que dificultam a interpretação dos resultados obtidos, como por exemplo quando o crescimento bacteriano não é suficiente para degradar o substrato que está sendo testado, dificultando assim a interpretação dos resultados. Além disso, algumas características são instáveis, apresentando variações decorrentes do meio de cultura utilizado. Assim, técnicas moleculares têm sido empregadas no estudo de *Lactobacillus* (Le JEUNE & LONVAUD-FUNEL, 1994).

2.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

A técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), consiste na clivagem do DNA genômico com endonucleases de restrição que quebram a molécula em sítios específicos. O número e a localização desses sítios são únicos para cada genoma, e portanto, o perfil dos fragmentos obtidos também é único. Esses fragmentos, os quais podem ser 50 ou mais, formam um perfil de restrição específico para um determinado organismo (LOGAN, 1994). Essa técnica é simples e rápida e requer pouca quantidade de DNA, podendo ser aplicada no estudo taxonômico de *Lactobacillus* (MANACHINI *et alii*, 1983; STÄHL *et alii*, 1990, 1994 a-b).

A técnica de RFLP possui a vantagem de ser tecnicamente mais fácil que outras técnicas moleculares, e tem boa capacidade de resolução em nível de gênero e espécie, se comparada com homologia DNA-DNA. O problema da técnica de restrição de DNA consiste no fato que os dados obtidos não são expressos por números, como é a técnica de homologia DNA-DNA. Entretanto, esse problema pode ser resolvido com o uso de análise matemática para os perfis obtidos (STÄHL *et alii*, 1990).

2.2.2. Hibridização.

As reações de hibridização (homologia DNA-DNA) utilizam a capacidade das moléculas de ácido nucleico de formarem fita dupla e manterem-se unidas por pontes de hidrogênio. Quando as pontes de hidrogênio são rompidas, por calor ou aumento de pH, ocorre a desnaturação da molécula de DNA. Se é incluída outra fita de DNA e restabelecidas as condições normais de pH e temperatura, as fitas podem se anelar com uma sequência complementar que estava presente na molécula original desnaturada (LOGAN, 1994).

As reações de hibridização não são apropriadas para espécies que não são altamente relacionadas (STÄHL *et alii*, 1990). É uma técnica que permite justificar se duas linhagens pertencem a espécies diferentes ou não (KAGERMEIER-CALLAWAY &

LAUER, 1995), revelando grupos genotípicos obtidos quando comparados com linhagens de composição de bases semelhantes (TAKIZAWA *et alii*, 1994).

STÄHL *et alii*, (1990, 1994 a-b), separaram linhagens de diferentes origens através de restrição de DNA associada a análise matemática e identificaram linhagens como *Lactobacillus reuteri*, *L.fermentum* e *L.plantarum*. Quando essas estirpes foram hibridizadas com linhagens tipo, exibiram homologia superior a 70%. Assim, linhagens de *Lactobacillus* que obtiveram mais de 70% de similaridade através de homologia DNA-DNA com uma linhagem tipo foram identificadas.

RFLP pode ser simplificada pela seleção de certas bandas por hibridização com uma sonda específica e assim, pode-se comparar um número menor de bandas, geralmente de 5-20. As linhagens podem então ser comparadas com base nesse novo perfil (PRIEST, 1993). O perfil que se obtém permite a diferenciação de espécies, subespécies e linhagens individuais (CASTELLASS *et alii*, 1993).

A seleção de certas bandas também pode ser feita com o uso de DNA do fago M13, que é usado como sonda devido à presença de uma sequência de 15 pares de bases repetidas consecutivamente ("in tandem"). Com essa sonda é possível comparar espécies e linhagens estritamente relacionadas ou taxonomicamente distantes; enquanto sondas espécie-específicas são restritas a espécies definidas. Em relação à técnica de restrição de DNA, esta possui a vantagem de analisar o genoma total, mas o número de bandas é menor, facilitando assim a interpretação quantitativa dos resultados. Essa técnica permite a identificação de *Lactobacillus* em nível de espécies, subespécies e linhagens; e em combinação com outras técnicas moleculares pode levar ao desenvolvimento de novos esquemas de classificação (MITEVA *et alii*, 1992).

2.2.3 Ribotipagem.

Outra técnica molecular amplamente utilizada é a ribotipagem. Esta técnica baseia-se em perfis gerados a partir dos genes que codificam para RNA ribossomal, foi aplicada para diferenciar linhagens de *Lactobacillus* (RODTONG & TANNOCK, 1993). É uma

técnica rápida e sensível para caracterização de linhagens em nível de espécie e subespécie, e tem sido aplicada por causa da grande variação intraespécie obtida pelos perfis. Além da capacidade de discriminação do método poder diferir para diferentes endonucleases de restrição, a ribotipagem pode também ser aplicada utilizando-se como sonda os genes 5S, 16S ou 23S (STÅHL *et alii*, 1994 b).

RODTONG & TANNOCK (1993), diferenciaram 54 linhagens de *Lactobacillus* usando ribotipagem, obtiveram ribotipos idênticos para duas linhagens que haviam sido identificadas como espécies diferentes (*L.acidophilus* e *L.fermentum*) por taxonomia clássica.

O método mais específico e que fornece mais informações para identificar microrganismos é o sequenciamento, que determina a sequência precisa de nucleotídeos de determinadas regiões do cromossomo. Genes conservados são sequenciados para estabelecer a posição de microrganismos num esquema taxonômico global; enquanto genes menos conservados podem ser usados para distinguir entre organismos individuais que são estritamente relacionados (TOWNER & COCKAYNE, 1993).

Porém é um método tecnicamente difícil e exige trabalho intenso (STÅHL *et alii*, 1990). Essa técnica associada com dados fisiológicos permite o desenvolvimento de uma estratégia geral para caracterizar novas espécies de *Lactobacillus*, pois separa espécies que não podem ser diferenciadas através do perfil de fermentação de carboidratos. Outra aplicação é desenvolver sondas para uma rápida identificação de espécies desconhecidas e de interesse (VOGEL *et alii*, 1994).

A análise de perfil de plasmídios é uma técnica aplicada para caracterizar bactérias; entretanto, a falta de estabilidade dos plasmídios por um longo tempo para algumas linhagens em particular, pode ser sua maior desvantagem (TOWNER & COCKAYNE, 1993). Mesmo assim, permite distinguir entre linhagens de *Lactobacillus* dentro de uma determinada espécie (TANNOCK *et alii*, 1990 e 1992).

2.2.4. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

A técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) consiste na amplificação de sequências de DNA usando-se “primers” escolhidos sem o prévio conhecimento das bases a serem copiadas. Assim, esse método não requer conhecimento prévio da biologia molecular dos organismos a serem estudados, e pode portanto ser aplicado a qualquer espécie. A técnica de RAPD também não requer determinado “primer” em particular, e pesquisadores de diferentes laboratórios podem escolher uma série padrão de “primers” e os resultados obtidos podem ser comparados entre diferentes laboratórios (WELSH *et alii*, 1990).

A técnica consiste no anelamento do “primer” com o DNA alvo em ciclos de amplificação a baixa estrigência (especificidade), resultando em produtos de amplificação que são característicos de um genoma em particular e denominado “fingerprinting” (WELSH *et alii*, 1990; WILLIAMS *et alii*, 1990). Essa técnica evita muitos problemas encontrados por outras técnicas moleculares, porque é uma técnica rápida e simples de ser executada. Sua alta capacidade discriminatória é útil para estudos epidemiológicos, mais especialmente para investigar fonte de infecções; para relacionar isolados de origens diferentes e identificar isolados diferentes de mesma origem (BARBUT *et alii*, 1993).

Porém, um alto nível de padronização e controle interno são necessários para se obter perfis reprodutíveis de DNA. Há muitos parâmetros nos quais pequenas mudanças alteram os perfis (NIEDERHAUSER *et alii*, 1994). Apesar do conceito da técnica ser simples, esses parâmetros devem estar dentro de limites ótimos para reprodutibilidade; isto é, concentrações adequadas de DNA, magnésio, “primer” e enzima, assim como número de ciclos (BASSAM *et alii*, 1992).

Variando-se a sequência e o tamanho dos “primers” usados para RAPD, pode-se obter um número ilimitado de comparações possíveis entre os perfis, aumentando assim seu poder discriminatório (SANDERY *et alii*, 1994).

Quanto à reprodutibilidade da técnica, RASMUSSEN *et alii* (1994) testou o mesmo experimento em quatro diferentes termociclizadores, cada um com temperaturas diferentes, porém localizados no mesmo laboratório, e obteve perfis idênticos. Isso indica que a temperatura em geral não é um parâmetro crítico. Entretanto quando ele testou as mesmas linhagens em outro termociclizador de outro laboratório e com reagentes desse laboratório, os perfis obtidos foram muito diferentes. Nesse caso, muitos fatores como água, reagentes de lise e amplificação interferem na reação.

O perfil de RAPD de DNAs obtidos por centrifugação exibe diferenças quando comparado com o perfil de DNAs obtidos por coleta em bastão de vidro (MICHELI *et alii*, 1994; ABED *et alii*, 1995).

Dependendo do "primer" empregado, a análise do perfil de DNA resulta em diferentes níveis de discriminação entre linhagens de *Campylobacter*, e permite correlação dos resultados obtidos com sorotipagem para diferenciar linhagens pertencentes ao mesmo sorotipo. Os resultados de RAPD não dependem da expressão de genes, e refletem diretamente a presença de sequências polimórficas no DNA (MAZURIER *et alii*, 1992).

Pode-se comparar a técnica de RAPD com outras técnicas, moleculares ou não (como por exemplo, sorotipagem) e observar suas vantagens em relação a elas.

RAPD aplicado a linhagens de *Legionella pneumophila* é mais discriminatório que RFLP, porque permite distinguir entre isolados que apresentam o mesmo perfil para RFLP; além disso é uma técnica mais rápida e econômica que elimina passos complexos presentes na técnica de RFLP (SANDERY *et alii*, 1994).

RAPD permitiu a observação de uma linhagem epidêmica, e a discriminação entre linhagens tóxicas e não-tóxicas de *Clostridium difficile*, podendo assim ser aplicado para estudos epidemiológicos; visto que sorotipagem e outras técnicas moleculares, como análise de plasmídios, RFLP e ribotipagem com sonda universal não foram tão eficientes (McMILLIN & MULDROW, 1992; BARBUT *et alii*, 1993).

A indústria de biotecnologia frequentemente necessita identificar uma linhagem em particular e discriminá-la das outras. As linhagens utilizadas em processos de produção são muitas vezes protegidas por patentes, mas, como identificar uma linhagem em particular? Isso é um problema de caracterização, e a técnica de RAPD fornece um “fingerprinting” da linhagem de interesse (PRIEST, 1993).

A TABELA 1 mostra alguns microrganismos que foram caracterizados pela técnica de RAPD.

TABELA 1: Alguns microrganismos analisados através da técnica de RAPD.

Microrganismos	Referências
<i>Bacillus thuringiensis</i>	BROUSSEAU <i>et alii</i> , 1993
<i>Bacillus sphaericus</i>	WOODBURN <i>et alii</i> , 1995
<i>Campylobacter</i>	MAZURIER <i>et alii</i> , 1992
<i>Clostridium difficile</i>	McMILLIN & MULDROW, 1992; BARBUT <i>et alii</i> , 1993
<i>Legionella pneumophila</i>	SANDERY <i>et alii</i> , 1994
<i>Lactococcus lactis</i>	CANCILLA <i>et alii</i> , 1992
<i>Listeria monocytogenes</i>	CZAJKA <i>et alii</i> , 1993; NIEDERHAUSER <i>et alii</i> , 1994
<i>Listeria</i> spp.	FARBER & ADDISON, 1994
<i>Streptococcus uberis</i>	JAYARAO <i>et alii</i> , 1991; CANCELLA <i>et alii</i> , 1992
<i>Enterococcus</i> spp.	JAYARAO & OLIVER, 1994
<i>Yersinia enterocolitica</i>	RASMUSSEN <i>et alii</i> , 1994

RAPD é uma técnica que tem sido empregada com sucesso para diferenciar linhagens de *Listeria*, e pode ter aplicação útil para *Lactobacillus*. Além do mais, permite mais estudos comparativos entre as técnicas e possibilita a descrição de sistemas de caracterização para os *Lactobacillus* de maior interesse.

É necessária a aplicação de técnicas de caracterização para um grupo maior de espécies e meio-ambientes, assim como estudos sobre *Lactobacillus* contaminantes. A importância desse gênero na esfera industrial, humana e animal justifica o desenvolvimento e implementação de técnicas de caracterização (DYKES & HOLY, 1994b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Bacterianas.

As linhagens bacterianas estudadas foram fornecidas pela Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" (CCT). Suas procedências encontram-se listadas na Tabela 2. As linhagens de *Lactobacillus* liofilizadas, fornecidas pela CCT, foram isoladas como contaminantes de usinas de açúcar e álcool dos municípios de Piracicaba (Usina Modelo), e de Jaboticabal (Usina Santa Adélia), ambas do interior do estado de São Paulo. Foram estudadas linhagens tipo de *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. brevis* e *L. buchneri*; e também *Lactobacillus* de outras coleções de culturas.

As ampolas com amostras liofilizadas foram reativadas em caldo MRS (Difco Laboratories), DeMAN *et alii* (1960), incubadas a 30°C por 24-48 horas (KANDLER & WEISS, 1986) e checadas quanto a sua pureza por esgotamento através de estrias em ágar MRS e coloração de Gram. As linhagens foram congeladas a -80°C em caldo nutriente contendo 10% de glicerol.

3.2. Caracterização Fenotípica.

3.2.1. Inóculo das galerias de API 50 CHL.

O sistema API 50 CHL (bioMérieux) foi usado para determinar a utilização de 49 carboidratos. Esse sistema consiste de galerias contendo diferentes tipos de carboidratos desidratados. As galerias são inoculadas com uma suspensão padronizada da linhagem de interesse.

As linhagens, após reativação, foram crescidas em MRS ágar a 30°C por 24-48 horas. As galerias do sistema API 50 CHL foram inoculadas segundo as instruções do fabricante (FIGURA 1). As colônias foram coletadas das placas de MRS ágar e suspensas em 2 ml de solução salina 0,9% esterilizada, formando assim uma suspensão densa. Gotas dessa suspensão densa foram transferidas para 5 ml de salina esterilizada, ajustando-se sua concentração para o número 2 da escala de Mc Farland. O dobro do número de gotas usadas para ajustar a salina de 5 ml foi adicionado a um meio líquido que foi distribuído nas galerias de API. As galerias foram seladas com óleo mineral estéril (Nujol) e incubadas a 30°C por 24-48 horas. Os resultados foram anotados com 24 e 48 horas de incubação.

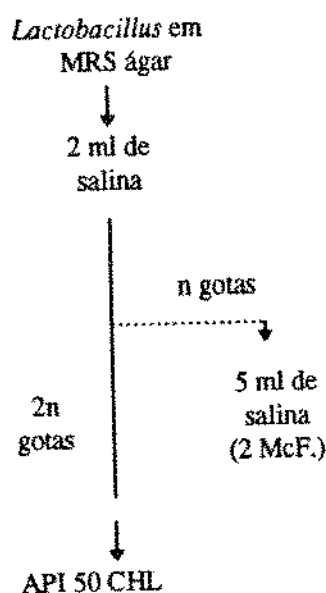


FIGURA 1: inoculação no sistema API 50 CHL.

3.2.2. Análise numérica dos resultados de fermentação de carboidratos.

Os resultados obtidos com a fermentação de carboidratos foram submetidos a análise numérica (KOTZEKIDOU & ROUKAS, 1986; MOLIN *et alii*, 1993; e JOHANSSON *et alii*, 1995), utilizando o coeficiente de similaridade de pareamento

simples ($S_{(SM)}$), proposto por SOKAL & MICHENER (1958). As linhagens foram agrupadas em um dendrograma utilizando-se o algoritmo de UPGMA, “Unweighted Pair-Group Arithmetic Average Clustering” (SOKAL & MICHENER, 1958).

TABELA: 2 - Linhagens de *Lactobacillus* analisadas.

Linhagens (CCT)	Identificação	Procedência*
1025	<i>L. fermentum</i>	a
1024	<i>L. fermentum</i>	a
0845	<i>L. fermentum</i>	
1021	<i>L. fermentum</i>	a
1409	<i>L. fermentum</i>	b
1398	<i>L. fermentum</i>	b
1406	<i>L. fermentum</i>	b
1415	<i>L. fermentum</i>	b
1417	<i>L. fermentum</i>	b
1412	<i>L. fermentum</i>	b
1414	<i>L. fermentum</i>	b
1384	<i>L. fermentum</i>	b
1405	<i>L. fermentum</i>	b
1057	<i>L. fermentum</i>	a
1055	<i>L. fermentum</i>	a
1397	<i>L. fermentum</i>	b
1400	<i>L. fermentum</i>	b
1410	<i>L. fermentum</i>	b
1407	<i>L. fermentum</i>	b
0559	<i>L. fermentum</i>	CIP 53.163
1467	<i>L. fermentum</i>	ATTC 9338
2571	<i>L. fermentum</i> ^T	ATCC 14931
1033	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i> **	a
1035	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a
1006	<i>L. fermentum</i>	a
1013	<i>Lactobacillus</i> sp.	a
1014	<i>Lactobacillus</i> sp.	a
1016	<i>L. fermentum</i>	a
1019	<i>L. fermentum</i>	a
1022	<i>L. fermentum</i>	a
1029	<i>L. fermentum</i>	a
1037	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a
1038	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a
1039	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. brevis</i> / <i>L. buchneri</i> ***	a
1040	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a
1042	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a

TABELA 2 (cont.).

Linhagens (CCT)	Identificação	Procedência*
1043	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a
1046	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a
1047	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i>	a
1048	<i>L. fermentum</i>	a
1049	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. brevis</i> / <i>L. buchneri</i>	a
1050	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. brevis</i> / <i>L. buchneri</i>	a
1052	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. brevis</i> / <i>L. buchneri</i>	a
1053	<i>L. fermentum</i>	a
1054	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. brevis</i> / <i>L. buchneri</i>	a
1060	<i>L. fermentum</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. brevis</i> / <i>L. buchneri</i>	a
3433	<i>L. reuteri</i> ^T	JCM 1112
3746	<i>L. buchneri</i> ^T	JCM 1115
3745	<i>L. brevis</i> ^T	JCM 1059
3434	<i>L. fermentum</i>	JCM 1173
1684	<i>L. fermentum</i>	
1399	<i>L. fermentum</i>	b
4420	<i>L. fermentum</i>	JCM 2767
4402	<i>L. fermentum</i>	JCM 2761
1385	<i>L. fermentum</i>	b
4403	<i>L. fermentum</i>	JCM 2766
1343	<i>Lactobacillus</i> sp.	
1387	<i>L. fermentum</i>	b
4398	<i>L. fermentum</i>	JCM 1137

a = Usina Modelo (Piracicaba-1985).

b = Usina Santa Adélia (Jaboticabal-1989).

^T = Linhagem tipo.

* CCT, Coleção de Culturas Tropical, Fundação de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", rua Latino Coelho, 1301, CEP 13087-010, Campinas, SP, Brasil; JCM, Japan Collection of Microorganisms, The Institute of Physical and Chemical Research (Riken), Wako, Saitama 351-01, Japan; ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776, U.S.A.; CIP, Collection de Bactéries de L'Institut Pasteur, 25-28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

** As linhagens foram designadas como *L. fermentum* / *L. reuteri* porque possuíam características das duas espécies, sendo que não foi possível concluir a qual espécie ela pertencia.

*** As linhagens foram designadas como *L. fermentum* / *L. reuteri* / *L. brevis* / *L. buchneri* porque possuíam características das quatro espécies, sendo que não foi possível concluir a qual espécie ela pertencia.

3.3. RAPD.

3.3.1. Extração de DNA.

A lise e extração de DNA das linhagens de *Lactobacillus* foram feitas segundo a técnica de YOUNG & BLAKESLEY (1991) modificada por COUTINHO *et alii*, 1993. As linhagens de *Lactobacillus* foram crescidas em 3 ml de caldo MRS a 30°C por 24 horas. Os 3 ml de cultura foram coletados em tubos Eppendorf de 1,5 ml, centrifugados em microcentrífuga (Sorvall MC 12V) por 4 minutos a aproximadamente 12.000 g e o sobrenadante descartado.

As células foram lavadas uma vez com tampão Tris-EDTA pH 8,0 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), centrifugadas por 4 minutos a aproximadamente 12.000 g e o sobrenadante descartado.

As células foram suspensas em 100 µl de uma solução de proteinase K (Sigma) na concentração de 100 ng/µl em Tris-EDTA pH 8,0. A suspensão foi incubada em banho-maria a 55°C por 15 minutos e em seguida foi incubada em banho-maria a 80°C por mais 15 minutos para lise das células e inativação da proteinase.

Após a lise, a solução foi centrifugada por 4 minutos a aproximadamente 12.000 g e o sobrenadante transferido para tubo Eppendorf de 1,0 ml.

3.3.2 Estimativa da concentração de DNA.

A concentração dos DNAs extraídos foi estimada visualmente através do método de eletroforese em gel de agarose (MANNIATIS *et alii*, 1982), por comparação com amostras de DNA do fago lambda (Promega).

Para estimativa visual da concentração de DNA dos lisados, foram aplicados 5 µl de cada DNA em gel de agarose 0,7% em tampão tris-borato-EDTA (T.E.B.). Foi acrescentado 1µl de uma solução de brometo de etídio 10 µg/µl. Cada amostra de lisado ou do fago lambda, foi previamente misturada com 2µl de corante azul de bromofenol (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25%; SAMBROOK, 1989).

TABELA 3: Tampão tris-borato-EDTA (T.E.B.).

*T.E.B.	
Trizma Base (Sigma)	0,089 M
Ácido Bórico (Ecibra)	0,089 M
EDTA 0,5 M, pH 8,0 (Synth)	200 µM
H ₂ O destilada	

As concentrações de DNA do fago lambda utilizadas foram: 4,6 µg/ml; 9,2 µg/ml; 13,8 µg/ml; 18,4 µg/ml; 23 µg/ml; 32,2 µg/ml e 46 µg/ml.

A eletroforese foi desenvolvida por 1 hora em tampão T.E.B. 1x a 50 volts no sistema GNA 200 (Pharmacia).

O gel foi observado em transiluminador ultravioleta (Chromato-Vue modelo TES-40) e fotografado em filme Polaroid (preto e branco tipo 667).

3.3.3 RAPD.

Para a amplificação dos DNAs dos lisados foi preparada uma mistura de reação (Tabela 4).

TABELA 4: Mistura de reação de RAPD.

Descrição	25 µl de reação
Nucleotídeos - dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega)	0,2 mM cada
DNA polimerase - Super Taq (HT Biotechnology Ltda.)	0,5 U
Tampão de reação da enzima Super Taq 10x (HT Biotechnology Ltda.)	1X
“Primer” UBC (University of British Columbia-Biotechnology Laboratory)	1 µM
DNA	5 ng / reação
H ₂ O deionizada	q.s.p. 25 µl

Foi feita uma triagem inicial com 10 “primers”, dos quais dois foram selecionados e usados em reações separadas para a caracterização das linhagens de *Lactobacillus*:

-UBC 2 : 5'-CCT GGG CTT G-3'

-UBC 5 : 5'-CCT GGG CTG G-3'

A mistura de reação foi preparada com todos os componentes descritos acima, exceto o DNA, e alíquotas de 20 µl foram distribuídas em tubos Eppendorf de 200 µl para PCR (Perkin Elmer). O DNA foi então adicionado a cada um dos tubos. No tubo controle, o DNA foi substituído por 5 µl de água deionizada estéril.

As reações de amplificação foram desenvolvidas em um ciclisador térmico GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer), segundo o programa da Tabela 5.

TABELA 5: Ciclos das reações de RAPD, (INNIS, 1990).

Ciclo 1	95°C - 2 minutos	Desnaturação inicial
Ciclo 2 (30 vezes)	94°C - 30 segundos	Desnaturação
	36°C - 30 segundos	Anelamento
	/ ramp 1 minuto	
Ciclo 3	72°C - 1 minuto	Extensão
	72°C - 3 minutos	Extensão final

Após o término dos ciclos, os produtos de RAPD foram estocados a 4°C.

Os produtos de RAPD foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão T.E.B. 1X. Alíquotas de 5 µl de cada produto de RAPD foram aplicados no gel após serem misturados com 2 µl de azul de bromofenol conforme descrito anteriormente. A eletroforese foi desenvolvida em tampão T.E.B. 1X a 70 volts (sistema GNA 200-Pharmacia), por 4 horas a temperatura ambiente. DNA do fago lambda digerido com a enzima de restrição *Bgl*II (Gibco BRL) foi utilizado como padrão de peso molecular.

3.3.4. Análise numérica dos padrões de RAPD.

As linhagens puderam ser comparadas através de uma padronização entre os géis e cálculo dos pesos moleculares usando-se como referência os fragmentos de DNA do fago lambda digerido com a enzima de restrição *Bgl*II. Os perfis de bandas de cada reação foram transformados em peso molecular utilizando-se o programa Eletroforese (LEITE, A., CBMEG, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo).

A matriz de dados de ausência/presença de bandas de RAPD foi analisada através do “software” RAPDistance (ARMSTRONG, J.; GIBBS, A.; PEAKALL, A.; WEILLER, G.; Australian National University). Os padrões foram comparados pelo coeficiente de APOSTOL (1993), e um dendrograma foi construído.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Fenotípica.

O sistema API 50 CHL, inoculado com a linhagem *Lactobacillus fermentum* CCT 2571^T após 48 horas de incubação a 30°C é mostrado na FIGURA 2 (na realidade a cor vermelha deveria aparecer como azul escuro, porém por motivos técnicos relacionados a fotografia não foi possível obter tal coloração).

Os perfis de utilização de carboidratos das linhagens de *Lactobacillus* estudadas, obtidos com a utilização do sistema API 50 CHL, são apresentados na TABELA 6. O dendrograma construído à partir da análise de similaridade Simple Matching ($S_{(SM)}$) dos perfis de utilização de carboidratos das linhagens encontra-se na FIGURA 3. Observou-se a formação de três grupos, designados por A, B e C. Esses grupos foram definidos em nível de similaridade por volta de 50%, os quais agruparam 77,97% (46) das linhagens em nível de similaridade igual ou maior que 80%.

A linhagem tipo de *L. fermentum* CCT 2571 foi agrupada com a linhagem de *Lactobacillus* sp. CCT 1039, em um subgrupo distinto das demais linhagens tipo de *Lactobacillus*. *L. brevis* CCT 3745^T, *L. buchneri* CCT 3746^T e *L. reuteri* CCT 3433^T não foram agrupadas com as linhagens analisadas. Resultados semelhantes foram obtidos por SHAW & HARDING (1984), DYKES *et alii* (1994a), BORCH & MOLIN, (1988) e GRANT & PATTERSON (1991), em estudos de *Lactobacillus* contaminantes de produtos cárneos; onde os microrganismos contaminantes não se agruparam com linhagens tipo quando submetidos a análise numérica.

O grupo A foi formado pelas linhagens de *Lactobacillus* CCT 1343, 1055, 1684, 1399, 1037, 1024, 1014, 1052, 1054, 1050, 1049, 1013, 1060, 1033 e 1019. O grupo B foi formado pelas linhagens 1387, 4398, 1385, 1409, 1398, 1397, 1410, 1415, 1417,

1406, 1384, 1405, 1414, 1407 e 1412. O grupo C foi formado pelas linhagens 0845, 1022, 1021, 1043, 1035, 1046, 1047, 1057, 1016, 1029, 1006, 1040, 1042, 1053, 1048, 1038, 4420, 4403, 1025, 1400, 3745^T (*Lactobacillus brevis*), 3746^T (*Lactobacillus buchneri*), 3434, 1039, 2571^T (*Lactobacillus fermentum*), 3433^T (*Lactobacillus reuteri*), 4402, 0559 e 1467.

Todas as linhagens estudadas utilizaram esculina e não produziram ácido a partir de adonitol, D-fucose, D-lixose, dulcitol, eritritol, glicogênio, L-xilose, β -metil-xilosídeo, inositol, inulina, xilitol, e L-arabitol. As características dos grupos A, B e C são mostradas na TABELA 7.

Os perfis de utilização de carboidratos das linhagens estudadas foram comparados com a descrição das espécies de KANDLER & WEISS (1986), no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) e os açúcares que diferiram nos perfis foram apontados abaixo (DYKES *et alii*, 1994a).

O grupo A compreende os subgrupos 1, 2 e 3. O subgrupo 1 é constituído pelas linhagens de *Lactobacillus* sp CCT 1343 e *Lactobacillus fermentum* CCT 1055 que foram capazes de utilizar D-xilose, D-manose, N acetil glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiose e β gentiobiose; e não foram capazes de utilizar lactose, melibiose e D-rafinose.

O subgrupo 2 é formado pelas linhagens 1014, identificada como *Lactobacillus* sp; 1052, 1054, 1050 e 1049 que fazem parte do grupo denominado de *L. fermentum/L. reuteri/L. brevis/L. buchneri*. Essas linhagens tiveram a mesma origem (Usina Modelo), e apresentaram a mesma morfologia (bacilos Gram positivos isolados). Foram capazes de utilizar glicerol, D-manose, ramnose, manitol, sorbitol, N acetil glucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, celobiose, trealose, melezitose, β gentiobiose e D-turanose; e não se agruparam com nenhuma linhagem tipo. Dentre todas as 59 linhagens estudadas, as linhagens do subgrupo 2 foram os únicos microrganismos capazes de utilizar glicerol, exceto 1060, que foi agrupada com o referido grupo em nível de similaridade inferior a

80%. TALARICO *et alii* (1990) observaram que linhagens de *L. reuteri* não são capazes de utilizar glicerol como fonte de carbono, utilizando glicerol somente como um aceptor alternativo de hidrogênio durante o crescimento sobre carboidratos disponíveis. A propriedade de utilizar glicerol como fonte de carbono é rara em *Lactobacillus*, podendo ser usada como caracter diagnóstico (SHAW & HARDING, 1984). *Lactobacillus* sp. CCT 1049, 1052 e 1054 também foram as únicas linhagens capazes de utilizar amido. Esse resultado também foi encontrado por KHETARPAUL & CHAUHAN (1990a e 1990b), para linhagens de *L.brevis* e *L. fermentum*.

L. fermentum e *L. reuteri* são espécies estreitamente relacionadas, dificilmente diferenciáveis com base em caracteres fenotípicos (KANDLER & WEISS, 1986). *L. fermentum*/*L. reuteri* são diferenciados de *L. brevis* e *L. buchneri* principalmente pelas temperaturas máxima e mínima de crescimento, de acordo com KANDLER & WEISS (1986). Entretanto, embora normalmente não cresçam a 45°C, algumas linhagens de *L. brevis* e *L. buchneri* são capazes de crescer a 45°C, sendo confundidas com *L.fermentum* (SHARPE, 1981). Esse erro é particularmente frequente no caso de linhagens arabinose e/ou xilose positivas. As linhagens *L.brevis* e *L.buchneri* capazes de crescer a temperaturas elevadas usualmente crescem a 15°C, enquanto que *L. fermentum* não, o que permite distinguí-los (SILVA, 1988). Entretanto, SILVA(1988) concluiu que essa regra não auxiliou na diferenciação de linhagens que cresceram a 15°C e 45°C, semelhantes a *L. brevis*/*L. buchneri* mas que apresentaram um perfil de fermentação de carboidratos semelhante a *L. fermentum*/*L. reuteri*.

Dificuldades na classificação baseada nas temperaturas máxima e mínima de crescimento eram esperadas, pois esses dados, segundo BRYAN-JONES (1975), geralmente são insatisfatórios para *Lactobacillus* isolados de destilarias. Essas linhagens, segundo o mesmo autor, são adaptadas para crescer a temperaturas relativamente altas, selecionadas pelo ambiente severo das destilarias. O autor salienta as dificuldades e inadequação dos testes de crescimento a 15°C e 45°C na identificação de linhagens de *L. fermentum* e *L. brevis* isoladas em destilarias de whisky.

O subgrupo 3 é formado pela linhagem de *L. fermentum*/*L. reuteri* CCT 1033, e pela linhagem de *Lactobacillus fermentum* CCT 1019. Essas linhagens foram capazes de utilizar D-manose, L-sorbose, ramnose, manitol, α metil-D-glucosídeo, N acetil glucosamina, salicina, trealose, β gentiobiose, D-turanose e D-tagatose; e não utilizam maltose, lactose, melibiose e gluconato.

O grupo B é formado pelos subgrupos 4, 5, 6 e 7, onde todas as linhagens foram identificadas como *Lactobacillus fermentum* e não foram agrupadas com *L. fermentum* CCT 2571^T. O subgrupo 4 é formado pelas linhagens de *Lactobacillus* CCT 1387, 4398, 1385 e 1409, que foram capazes de utilizar L-arabinose e 5 ceto-gluconato e não utilizaram galactose, D-glucose, maltose, lactose, melibiose, sacarose, D-rafinose e gluconato. Essas linhagens apresentaram o mesmo perfil de utilização de carboidratos. O subgrupo 5 foi formado pelas linhagens 1397 e 1410, que utilizaram L-arabinose e 5 ceto-gluconato e, que não utilizaram galactose, D-glucose, maltose, lactose, melibiose, maltose, sacarose e D-rafinose. No subgrupo 6, formado por 1415, 1417 e 1406, as linhagens foram capazes de utilizar L-arabinose e 5 ceto-gluconato e não foram capazes de utilizar galactose, maltose, lactose, melibiose, D-rafinose e gluconato; essas linhagens também apresentaram o mesmo perfil de utilização de carboidratos, como no subgrupo 4.

As linhagens do subgrupo 4 possuem o mesmo perfil de utilização de carboidratos, o mesmo se observa com as linhagens do subgrupo 6. O subgrupo 7 apresentou duas linhagens de *L. fermentum* CCT 1384 e 1405 que apresentaram o mesmo perfil de utilização de carboidratos.

O grupo C compreende os subgrupos 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. O subgrupo 8 é formado pelas linhagens de *Lactobacillus fermentum* CCT 0845 e 1022, que utilizaram D-xilose, D-manose e 5-ceto-gluconato; e não utilizaram galactose, D-glucose, lactose e melibiose. O subgrupo 9 é formado pelas linhagens de *Lactobacillus fermentum* CCT 1021, e pelas linhagens de *L. fermentum*/*L. reuteri* CCT 1035 e 1043 que utilizaram 5-ceto-gluconato e não utilizaram galactose, D-glucose, lactose, melibiose e D-rafinose. O subgrupo 10 é formado pelas linhagens *L. fermentum*/*L. reuteri* CCT 1046 e 1047, e

Lactobacillus fermentum CCT 1057 que foram capazes de utilizar D-xilose e 5 ceto-gluconato, e não utilizaram galactose, lactose, melibiose e D-rafinose. O subgrupo 11 é formado pelas linhagens de *Lactobacillus fermentum* CCT 1006, e pelas linhagens de *L. fermentum/L. reuteri* CCT 1040 e 1042 que utilizaram D-xilose e 5 ceto-gluconato, e não utilizaram galactose e lactose. O subgrupo 12 é formado pelas linhagens de *Lactobacillus fermentum* CCT 4420 e 4403 que utilizaram L-arabinose, D-xilose, trealose e 5-ceto-gluconato, e não utilizaram lactose. O subgrupo 13 é formado pelas linhagens de *L. fermentum/L. reuteri/L. brevis/L. buchneri* CCT 1039, e pela linhagem *L. fermentum* CCT 2571^T. A linhagem CCT 1039 possui o mesmo perfil de utilização de carboidratos que a linhagem CCT 2571. O subgrupo 14 é formado pelas linhagens 0559 e 1467 descritas como *Lactobacillus fermentum*, que utilizaram D-xilose e não utilizaram sacarose.

GOBBETTI *et alii* (1994) descreveram linhagens de *L. brevis* que agruparam com linhagens de *L. fermentum*. Observou-se que o grupo C agrupou todas as linhagens tipo, isso já era esperado para *L. fermentum* e *L. reuteri*, que segundo KANDLER & WEISS (1986) são espécies estreitamente relacionadas que dificilmente podem ser diferenciadas com base em caracteres fenotípicos. Segundo esse autor, o mesmo ocorre para *L. brevis* e *L. buchneri*. O fato de *L. fermentum* pertencer ao mesmo grupo que *L. brevis* também foi observado por GOBBETTI *et alii* (1994).

O subgrupo 9 possui duas linhagens (1021 e 1043) que apresentaram o mesmo perfil de utilização de carboidratos, porém foram identificadas como *Lactobacillus fermentum* e *L. fermentum/L. reuteri* respectivamente. O subgrupo 10 é formado pelas linhagens 1046 e 1047 que apresentaram o mesmo perfil de utilização de carboidratos e que foram denominadas de *L. fermentum/L. reuteri*; e foram agrupadas em nível de similaridade maior que 85% com 1057 identificada como *Lactobacillus fermentum*. No subgrupo 11, as três linhagens apresentaram o mesmo perfil de fermentação de carboidratos, porém 1006 foi identificada como *Lactobacillus fermentum* e as demais como *L. fermentum/L. reuteri*. No subgrupo 13, as duas linhagens possuem o mesmo perfil de fermentação de carboidratos.

As linhagens de *Lactobacillus fermentum* 4398, 4420, 4403, 3434 e 4402 obtidas de outras Coleções de Cultura foram agrupadas em grupos diferentes, a linhagem 4398 foi isolada de saliva e agrupada no “cluster” B; as demais linhagens, isoladas de melaço (4403 e 4402) e fermentação de beterraba (3434) foram agrupadas no grupo C, isso pode ser explicado, segundo BORCH & MOLIN, (1988) e HASTINGS *et alii* (1987) devido as linhagens terem sido isoladas de meios ambientes distintos.

Os resultados obtidos nos testes de fermentação de carboidratos, apresentaram divergências em relação aos dados de KANDLER & WEISS (1986), e está de acordo com BORCH & MOLIN (1988), Esses autores também observaram que linhagens de *Lactobacillus* apresentaram perfil de fermentação de carboidratos diferente das espécies descritas no Manual Bergey (1986). Resultados divergentes foram encontrados particularmente, nos testes de fermentação de lactose por linhagens identificadas como *L. fermentum*. OLIVA NETO (1990) observou uma grande incidência de linhagens lactose negativas, embora 90% ou mais linhagens dessa espécie fermentam lactose, segundo os dados de KANDLER & WEISS (1986); embora seja um dado importante na identificação de *Lactobacillus* isolados de leite, a fermentação de lactose é muito menos significativa para aqueles isolados de outras fontes. KANDLER & WEISS (1986), destacam que os plasmídios encontrados em *Lactobacillus* são frequentemente associados à fermentação de lactose e que o único exemplo de mutação genética natural em *Lactobacillus* é justamente a transmissão de um plasmídio que determina o metabolismo de lactose em *L. casei*.

O sistema API 50 CHL foi satisfatório para avaliar o perfil de fermentação de carboidratos de grande número de *Lactobacillus*, permitindo economia de tempo e espaço, apresentando reprodutibilidade (GRANT & PATTERSON, 1991).

4.2. RAPD.

Dez diferentes “primers” de 10 pares de bases (pb) cada um, foram testados com a linhagem tipo de *L. fermentum* (CCT 2571), para avaliar suas capacidades de produzirem

perfis para as linhagens de *Lactobacillus* estudadas (FIGURA 4). Os “primers” UBC 2 (5'-CCT GGG CTT G-3') e UBC 4 (5'-CCT GGG CTG G-3'), foram os selecionados com base no número de bandas produzidas, pois, segundo NIEDERHAUSER *et alii* (1994), o maior número de bandas obtidas aumenta o poder discriminatório entre as linhagens analisadas.

Não foram observados produtos de amplificação com o tubo controle contendo água, o que confirmou que a reação de RAPD ocorreu somente quando o DNA a ser analisado estava presente; assegurando-se assim que não houve contaminação com DNAs vindos de outras fontes, como por exemplo, da própria enzima *Taq* polymerase, como observado por SCHMIDT *et alii*, (1991).

A obtenção de DNA genômico se deu por lise da parede celular por digestão com proteinase K, onde os restos celulares foram separados por centrifugação e o sobrenadante diluído, segundo WELSH *et alii* (1990) é uma técnica de preparação de DNA simples e que consome menos tempo do que se fosse purificar totalmente o DNA.

A concentração de DNA utilizada nas amplificações influenciou na qualidade dos perfis obtidos. Foram usados 5 ng/reação, e quando a concentração foi aumentada para 10 ng/reação observaram-se alterações nos perfis de DNA (dados não mostrados), com diminuição na quantidade de bandas dos perfis. A explicação para isso, talvez seja o aumento de inibidores presentes, já que o DNA não estava totalmente purificado. NIEDERHAUSER *et alii* (1994), porém, obtiveram os mesmos perfis quando a concentração de DNA foi aumentada, embora esse DNA também não estivesse totalmente purificado. CANCELLA *et alii* (1992), testaram concentrações inferiores a 5 ng e obtiveram algumas variações no número e tamanho do fragmentos obtidos.

Os “fingerprintings” das linhagens estudadas, obtidos pela técnica de RAPD, foram resultantes da amplificação de seus DNAs, observando-se que para cada isolado analisado, foram produzidos perfis característicos. Esses perfis foram reprodutíveis em relação ao tamanho e ao número de bandas (dados não mostrados). Os fragmentos produzidos variaram em tamanho de 220-3012 pares de bases (pb) para o “primer” UBC 2; e de 263-

3012 pb para o “primer” UBC 4. O “primer” 2 produziu perfis de bandas distintas dos produzidos pelo “primer” 4; esses “primers” diferem em apenas uma base na sua composição, o que implica que a mudança de um único nucleotídeo na sequência do “primer” causa uma mudança no perfil dos segmentos de DNA amplificados (WILLIAMS *et alii*, 1990; e WELSH *et alii*, 1990).

As linhagens foram comparadas através de uma padronização entre os géis, calculando-se os pesos moleculares das bandas obtidas com os “primers” UBC 2 e UBC 4; e submetendo esses pesos moleculares a análise pelo “software” RAPDistance, resultando em um dendrograma (FIGURA 13).

Assim, quando os DNAs obtidos das 59 linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentação alcoólica e linhagens tipo foram amplificados, foram produzidos perfis reprodutíveis que revelaram polimorfismos nos perfis de RAPD, sugerindo grande diversidade entre os isolados, segundo FARBER & ADDISON (1994a). A detecção e análise de polimorfismos no DNA de uma determinada espécie tem sido amplamente utilizada no campo da epidemiologia, genética de populações e taxonomia (JAYARAO & OLIVER, 1994). Através dos perfis obtidos, foi possível caracterizar as linhagens e ainda, observar a formação de grupos distintos que possuíam características em comum. Esses resultados também foram obtidos por CZAJKA *et alii* (1993) trabalhando com linhagens de *Listeria monocytogenes*.

As linhagens 1049, 1050, 1052 1054 e 1060 foram agrupadas num mesmo grupo, o mesmo foi observado no dendrograma obtido à partir da utilização de carboidratos pelo sistema API 50 CHL. Observando-se as fotos com o “primer” 2 (FIGURA 5), e com o “primer” 4 (FIGURA 6) as linhagens apresentaram bandas em comum, mostrando um perfil característico para essas linhagens.

Também as linhagens 1409, 1398, 1415, 1417 e 1406 foram agrupadas no mesmo grupo (FIGURA 13). O mesmo foi observado no dendrograma construído à partir do API 50 CHL (FIGURA 3). Nas FIGURAS 5 e 7, com o “primer” 2, e FIGURAS 6 e 8, com o “primer” 4, as linhagens apresentaram perfil de bandas bastante semelhante.

O mesmo foi observado para as linhagens 1412, 1414, 1384, 1405, 1397, 1410 e 1407. Maiores semelhanças nos perfis de bandas foram observadas com o “primer” 4 (FIGURA 8), que com o “primer” 2 (FIGURA 7).

Na FIGURA 13, observou-se que as linhagens 0559, 1467, 1006, 1016, 1022 e 1029 foram agrupadas no mesmo grupo que a linhagem tipo de *Lactobacillus fermentum* (CCT 2571). O mesmo foi observado para o dendrograma obtido à partir do API 50 CHL (FIGURA 3).

Portanto, as linhagens pertencentes aos grupos formados pela análise dos perfis de fermentação de carboidratos, foram os mesmos observados quando a técnica de RAPD foi utilizada. A técnica de RAPD tem sido utilizada para discriminar linhagens de muitos tipos de organismos (CZAJKA & BATT, 1994); e também para determinar a similaridade entre diferentes isolados da mesma espécie bacteriana. As similaridades observadas entre os isolados analisados, através das semelhanças entre os perfis, implica em maiores relações genéticas, segundo FARBER & ADDISON (1994a). E a capacidade de se determinar a relação entre diferentes isolados bacterianos da mesma espécie é extremamente importante a fim de se localizar fontes de contaminantes e de se identificar reservatórios problemas (CZAJKA *et alii*, 1993), tendo assim a oportunidade de se monitorar a ocorrência de um subtipo bacteriano em particular (JAYARAO & OLIVER, 1994).

As linhagens 1343 e 1055 formaram um grupo em nível de similaridade maior que 85% quando analisadas segundo seu perfil de fermentação de carboidratos (FIGURA 3). Porém, com a técnica de RAPD, os “primers” UBC 2 e UBC 4 (FIGURAS 11 e 7, FIGURAS 12 e 8 respectivamente) foram capazes de produzir pouco número de bandas para as duas linhagens, e os perfis obtidos foram muito diferentes dos obtidos para as demais linhagens estudadas.

O mesmo se observou para as linhagens 1033 e 1019 (“primer” UBC 2: FIGURA 9; “primer” UBC 4: FIGURA 10).

Segundo KANDLER & WEISS (1986), *L. fermentum* e *L. reutei*, *L. brevis* e *L. buchneri* são espécies muito relacionadas, o que foi observado pelos seus perfis de fermentação de carboidratos, como discutido anteriormente. Observando-se os perfis obtidos com o “primer” 2 (FIGURAS 9 e 5, respectivamente), e com o “primer” 4 (FIGURAS 10 e 6, respectivamente), essas linhagens apresentaram “fingerprintings” característicos e distintos um do outro. Assim, diferenças nos perfis puderam ser observadas, mesmo entre espécies estreitamente relacionadas (CZAJKA *et alii*, 1993). A diversidade entre linhagens muito relacionadas de espécies diferentes de *Lactobacillus* têm sido demonstrada através de análise do DNA cromossomal por endonucleases de restrição (STÅHL & MOLIN, 1994a).

Algumas técnicas moleculares têm sido empregadas para caracterizar linhagens de *Lactobacillus*, tais como Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), sequenciamento de 16S rRNA, M13 DNA “fingerprinting” entre outras. Entretanto, alguns desses métodos não são compatíveis com a rotina de muitos laboratórios, devido ao alto custo, complexidade e tempo longo de execução. A técnica de RAPD é rápida, simples de se executada, apresenta resultados reprodutíveis podendo ser aplicada para microrganismos associados a humanos, animais e plantas. CHACHATY *et alii* (1994). Além disso, RAPD independe de variações associadas com condições de cultura ou caracterizações bioquímicas atípicas; e o uso de um “primer” universal pode produzir perfis característicos para muitos gêneros e espécies bacterianos permitindo a comparação entre laboratórios (JAYARAO & OLIVER, 1994).

4.3. Considerações Finais.

O uso do sistema API 50 CHL apresentou bons resultados para agrupar linhagens de *Lactobacillus fermentum* isolados como contaminantes de fermentação alcoólica, resultados semelhantes também foram obtidos por PARDO & ZUÑIGA (1992). E uma

boa relação entre os resultados obtidos por API 50 CHL e RAPD, foram obtidos, isto é, as linhagens do mesmo grupo fenotípico formaram os mesmos grupos quando RAPD foi utilizado; esses resultados estão de acordo com DICKS & VUUREN, (1988).

Esses resultados indicam a existência de grupos bem definidos de linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus* que estão presentes como contaminantes de fermentação alcoólica; essa afirmação está de acordo com pesquisadores que estudam linhagens de *Lactobacillus* presentes em diferentes tipos de substratos (SANZ *et alii*, 1988; HOLY *et alii*; 1991 e NAITO *et alii*, 1995).

Outras técnicas moleculares poderiam ser aplicadas aos grupos de linhagens observados (especialmente para o grupo designado como *L. fermentum*/*L. reuteri*/*L. brevis*/*L. buchneri*) como homologia DNA-DNA e conteúdo de G+C (guanina+citosina), através das quais se poderia analisar a relação entre as linhagens estudadas e a linhagem tipo, e assim avaliar o significado desses grupos como contaminantes de fermentação alcoólica, e futuramente descrevê-los como nova espécie (MÄKELÄ *et alii*, 1992). Também pode-se analisar as linhagens através de sequenciamento do RNA ribossômico da subunidade 16S (16S rRNA) e posterior construção de uma sonda com o objetivo de se identificar as linhagens de maior interesse (POT *et alii*, 1993).

Outras linhagens de *Lactobacillus* poderão ser analisadas segundo as mesmas técnicas e seus resultados comparados com os resultados apresentados, construindo assim uma base de dados.

Figuras e Tabelas



FIGURA 2: Sistema API 50 CHL inoculado com *Lactobacillus fermentum*^T CCT 2571.

TABELA 6: Perfis de fermentação de carboidratos utilizando sistema API 50 CHL, de linhagens de *Lactobacillus*.

produção de ácido	linhagens de <i>Lactobacillus</i>																															
a partir de:	1025	1024	O845	1021	1409	1398	1406	1412	1414	1384	1405	1057	1055	1397	1400	1410	1407	O559	1467	2571	1033	1035	1006	1013	1014	1016	1019	1022	1029	1037	1038	1039
glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
L-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-metil-xilosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
galactose	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
D-glucose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ramnose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metil-D-manosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
metil-D-glucosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
N-acetil-glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
arbutina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
salicina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
celobiose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
maltose	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
melibiose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
sacarose	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
trealose	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D-rafinose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B-gentiobiose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
D-turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
D-litose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gluconato	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
2-ceto-gluconato	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+

TABELA 6 (cont.): Perfis de fermentação de carboidratos utilizando sistema API 50 CHL, de linhagens de *Lactobacillus*.

produção de ácido	linhagens de <i>Lactobacillus</i>																											
a partir de:	1043	1046	1047	1048	1049	1050	1052	1053	1054	1060	3433	3746	3745	1415	1417	3434	4420	1385	4403	1343	1684	1399	4402	4398	1387	1040	1042	
glicerol	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-arabinose	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-xilose	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
L-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-metil-xilosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
galactose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
D-glucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
D-frutose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-manose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ramnose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
manitol	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
metil-D-manosídeo	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
metil-D-glucosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N-acetil-glucosamina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
amigdalina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
arbutina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
salicina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
celobiose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	
lactose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
melibiose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	
trealose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
melezitose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
D-rafinose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
amido	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
glicogénio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-gentiobiose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
D-turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-lixose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-arabitol	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
gluconato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	
5-ceto-gluconato	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	

TABELA 7: Características dos grupos de *Lactobacillus*. Os microrganismos foram agrupados de acordo com métodos de taxonomia numérica. Os números nas colunas A, B e C representam porcentagem (%) das linhagens dos respectivos grupos que produziram ácido à partir da utilização de diferentes carboidratos.

	A (%)	B (%)	C (%)	linhagens tipo			
				2571	3745	3746	3433
número de linhagens	15	15	29	1	1	1	1
produção de ácido à partir							
glicerol	40	0	0	-	-	-	-
eritritol	0	0	0	-	-	-	-
D-arabinose	0	0	3,5	-	-	-	-
L-arabinose	40	100	44,8	-	+	+	+
ribose	86,7	100	100	+	+	+	+
D-xilose	46,7	0	72,4	-	+	+	-
L-xilose	0	0	0	-	-	-	-
adonitol	0	0	0	-	-	-	-
B-metil-xilosídeo	0	0	0	-	-	-	-
galactose	100	6,7	48,3	+	+	+	+
D-glucose	100	26,7	82,7	+	+	+	+
D-fucose	100	100	93,1	+	+	+	+
D-manose	100	0	13,8	-	-	-	-
L-sorbose	13,3	0	0	-	-	-	-
ramnose	60	0	3,5	-	-	-	-
dulcitol	0	0	0	-	-	-	-
inositol	0	0	0	-	-	-	-
manitol	73,3	0	6,9	-	-	+	-
sorbitol	33,3	0	3,5	-	-	-	-
metil-D-manosídeo	33,3	0	0	-	-	-	-
metil-D-glicosídeo	20	0	6,9	-	-	-	-
N acetil glucosamina	93,3	0	6,9	-	+	+	-
amigdalina	73,3	0	0	-	+	+	-
arbutina	86,7	0	0	-	-	-	-
esculina	100	100	100	+	+	+	+
salicina	100	0	3,5	-	-	-	-
celobiose	86,7	0	0	-	-	-	-
maltose	80	6,7	100	+	+	+	+
lactose	53,3	0	27,6	+	+	-	+
melibiose	60	0	55,2	+	+	+	+
sacarose	93,3	46,7	89,6	+	-	+	+
trealose	80	6,7	17,2	-	-	-	-
inulina	0	0	0	-	-	-	-
melezitose	46,7	0	6,9	-	-	+	-
D-rafinose	60	0	62,1	+	-	+	+
amidon	20	0	0	-	-	-	-
glicogênio	0	0	0	-	-	-	-
xilitol	0	0	0	-	-	-	-
B-gentiobiose	93,3	0	0	-	-	-	-
D-turanose	46,7	0	0	-	-	-	-
D-lixose	0	0	0	-	-	-	-
D-tagatose	20	13,3	6,9	-	-	-	-
D-fucose	0	0	0	-	-	-	-
L-fucose	6,7	0	0	-	-	-	-
D-arabitol	40	0	0	-	-	-	-
L-arabitol	0	0	0	-	-	-	-
gluconato	86,7	20	96,6	+	+	+	+
2 ceto-gluconato	13,3	0	0	-	-	-	-
5 ceto-gluconato	46,7	86,7	72,1	-	+	+	-

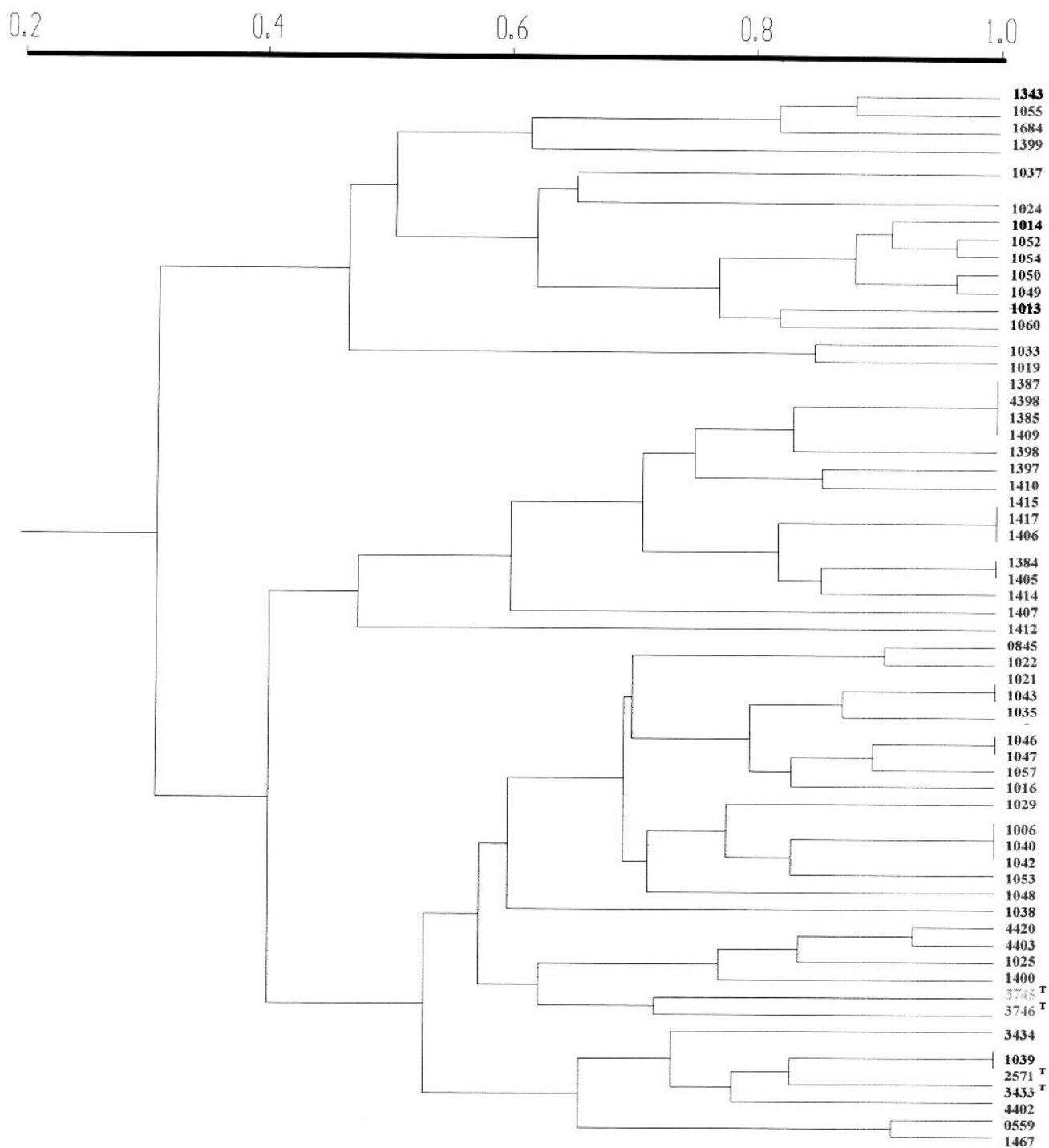


FIGURA 3: Dendrograma de linhagens de *Lactobacillus* de acordo com fermentação de carboidratos usando sistema API 50 CHL.

L.fermentum *L.fermentum/L.reuteri*
L.fermentum/L.reuteri/L.brevis/L.buchneri *L.reuteri*^T *L.brevis*^T *L.buchneri*^T *Lactobacillus* sp.

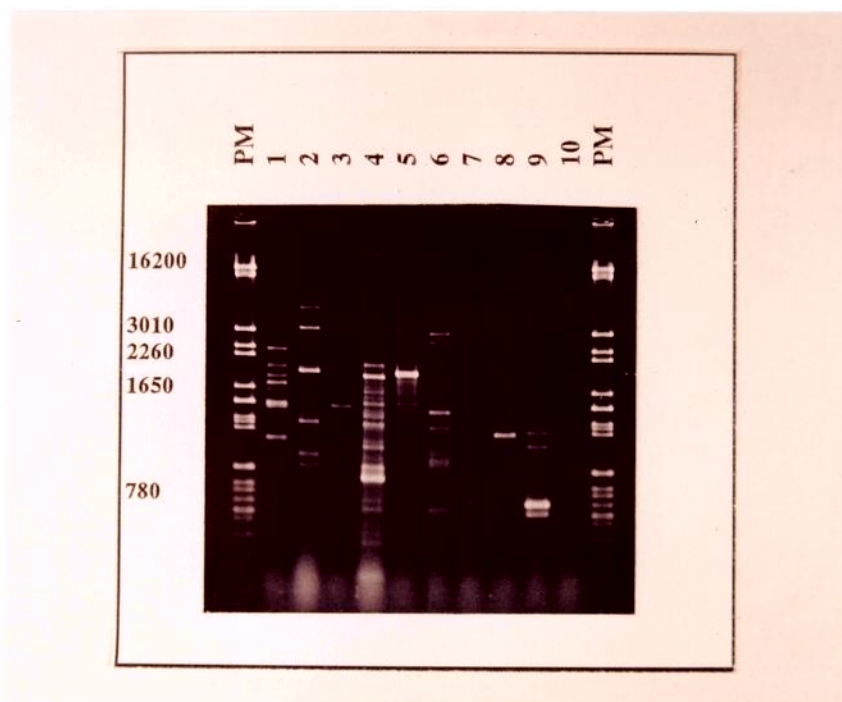


FIGURA 4: Triagem de “primers” UBC 1-10 com DNA da linhagem tipo de *Lactobacillus fermentum*. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl*II).

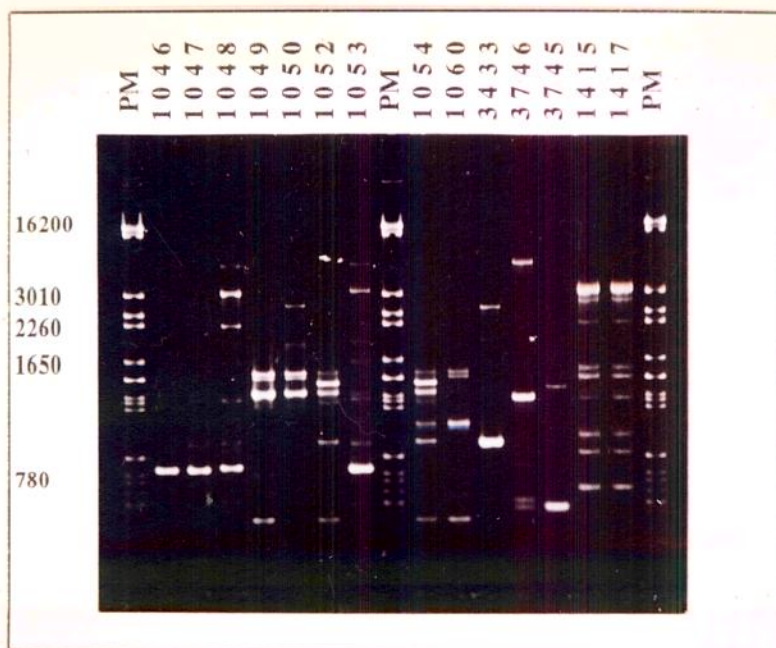


FIGURA 5: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

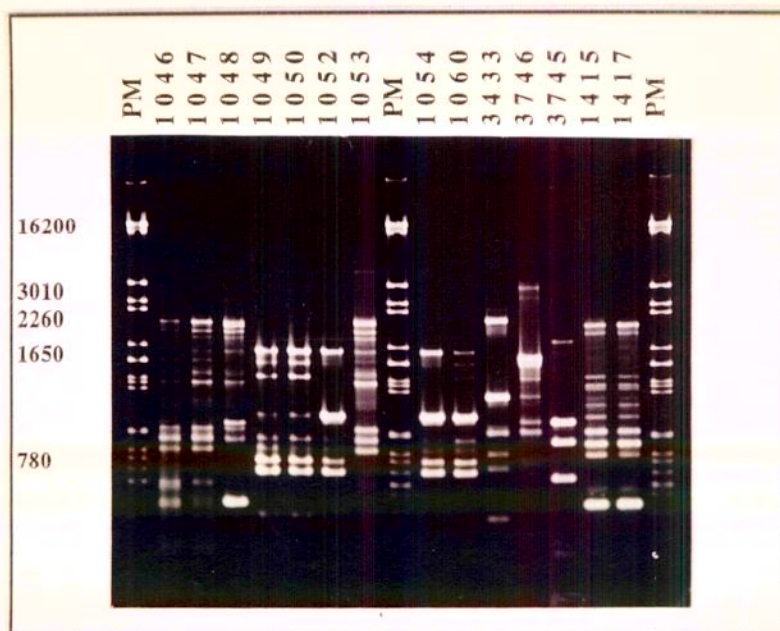


FIGURA 6: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

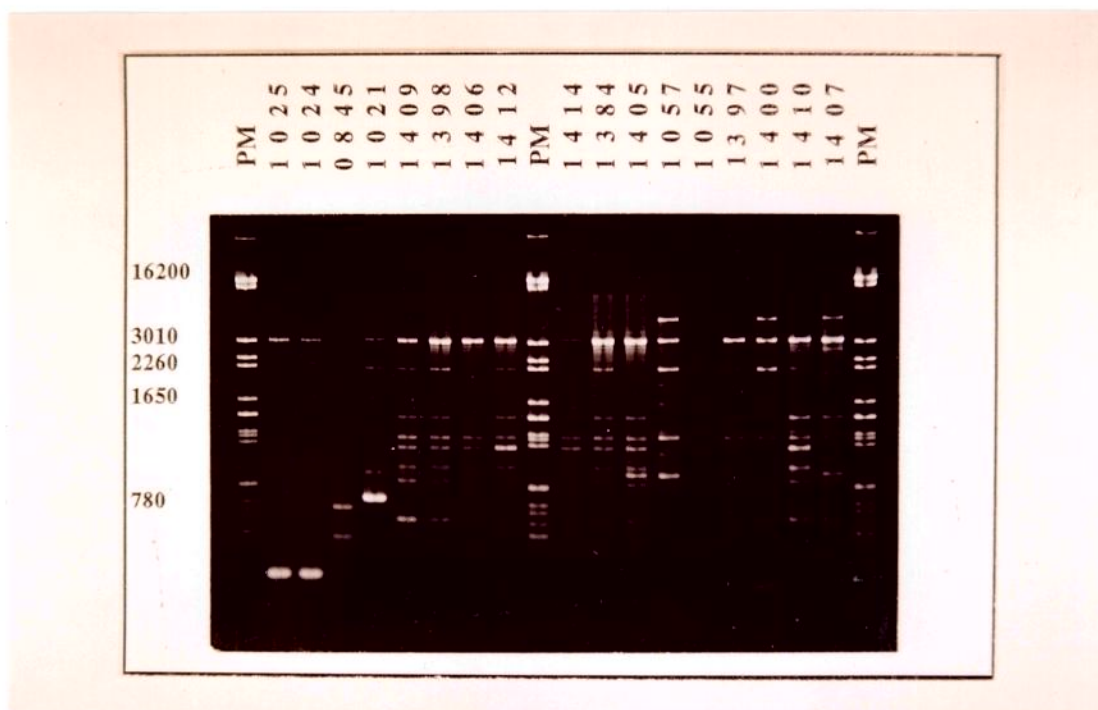


FIGURA 7: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

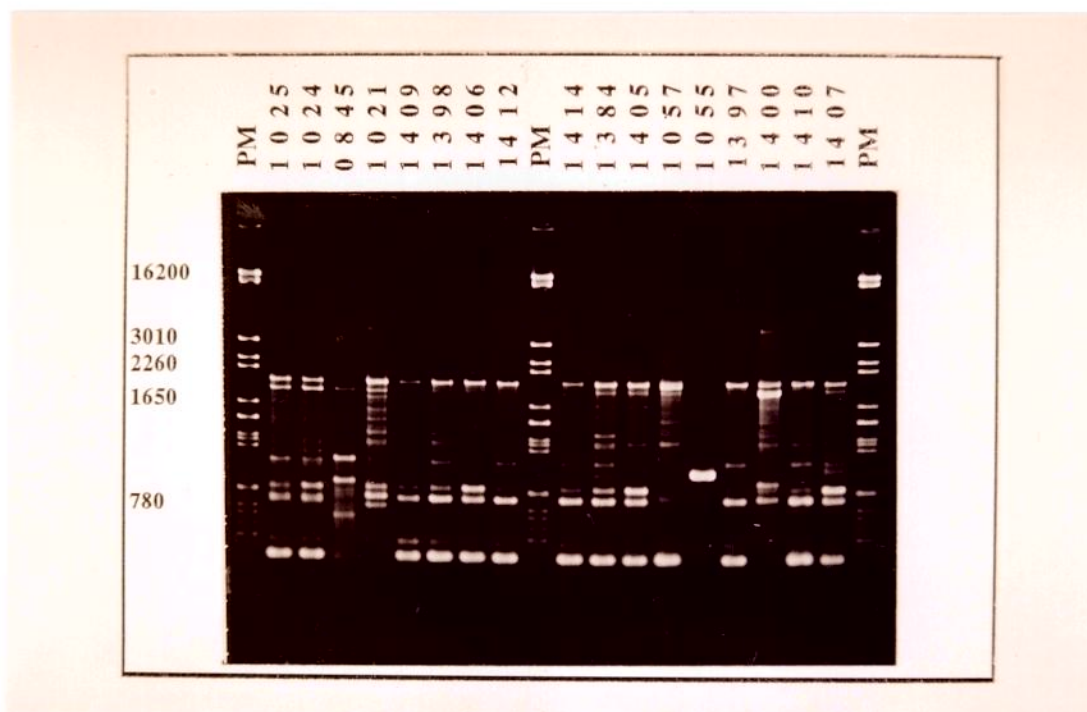


FIGURA 8: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

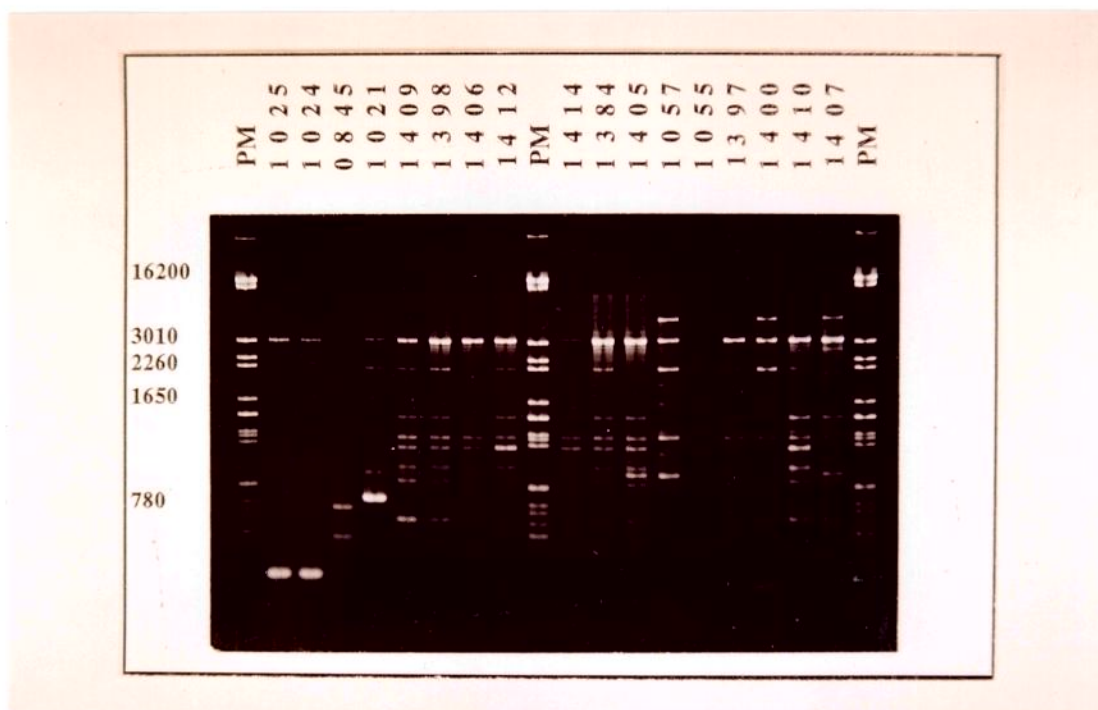


FIGURA 7: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

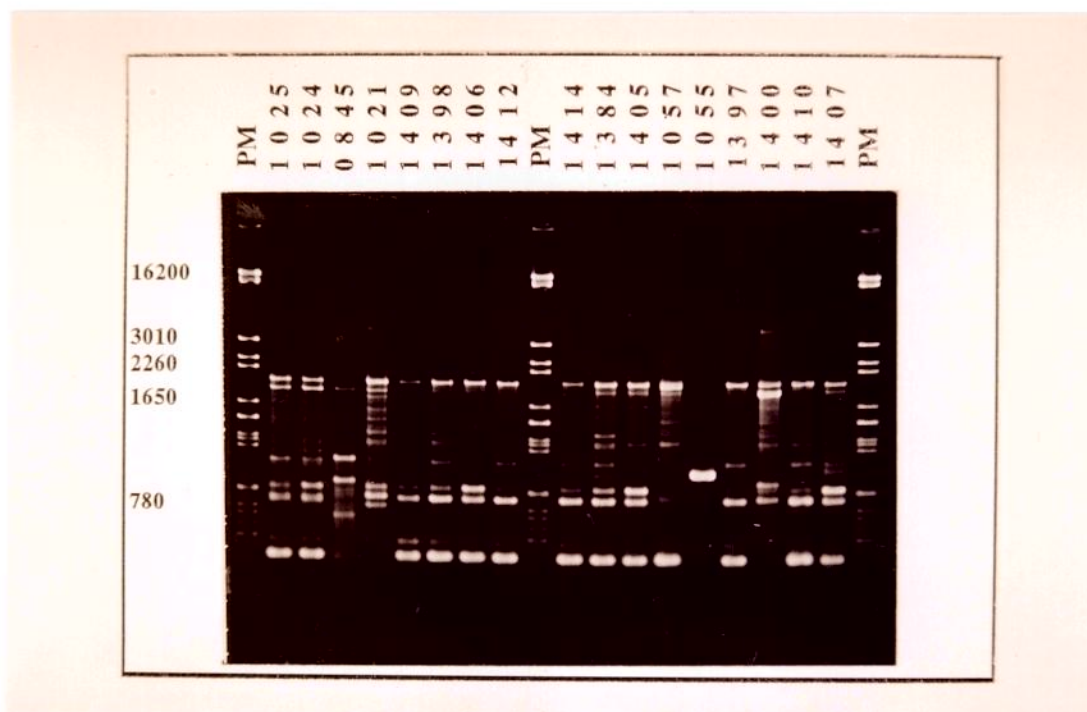


FIGURA 8: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

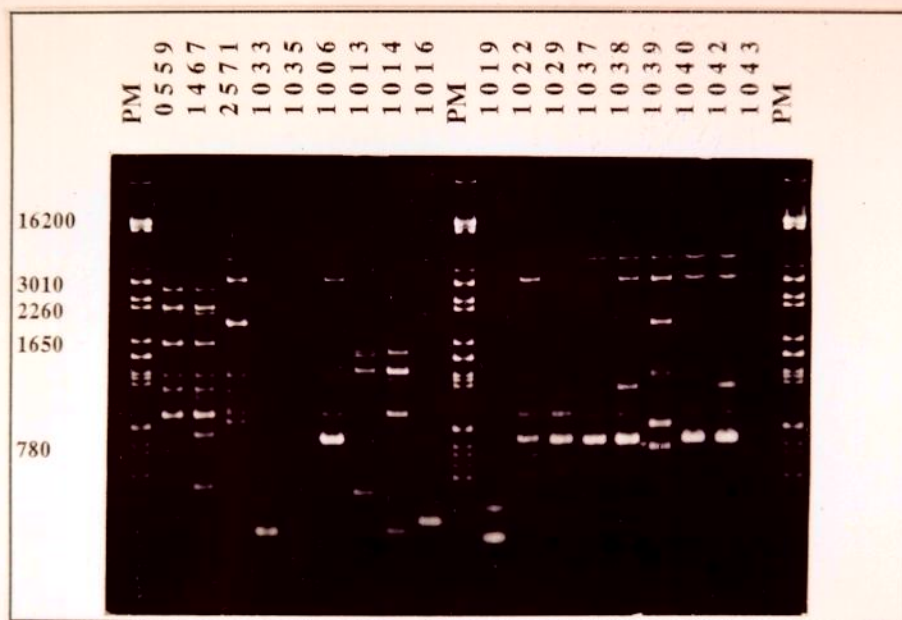


FIGURA 9: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 2 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

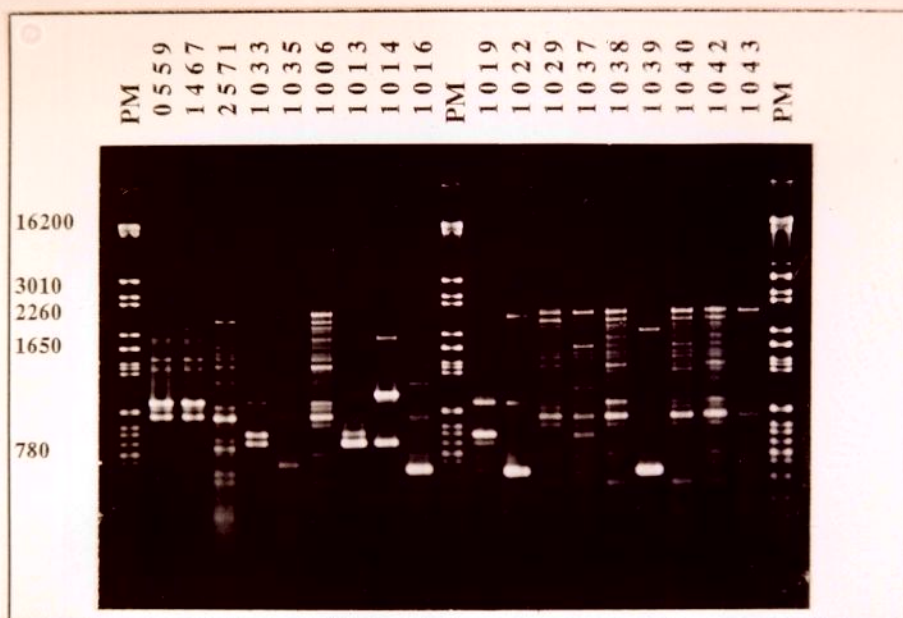


FIGURA 10: "Fingerprinting" de linhagens de *Lactobacillus* usando "primer" UBC 4 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

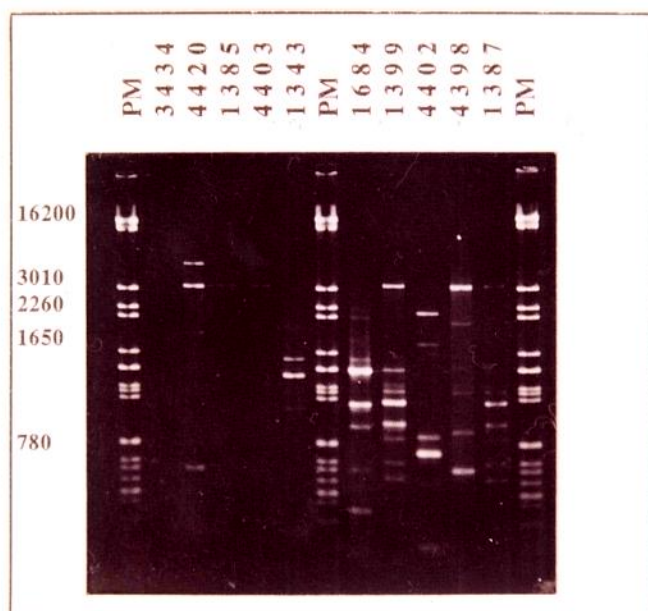


FIGURA 11: “Fingerprinting” de linhagens de *Lactobacillus* usando “primer” UBC 2 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

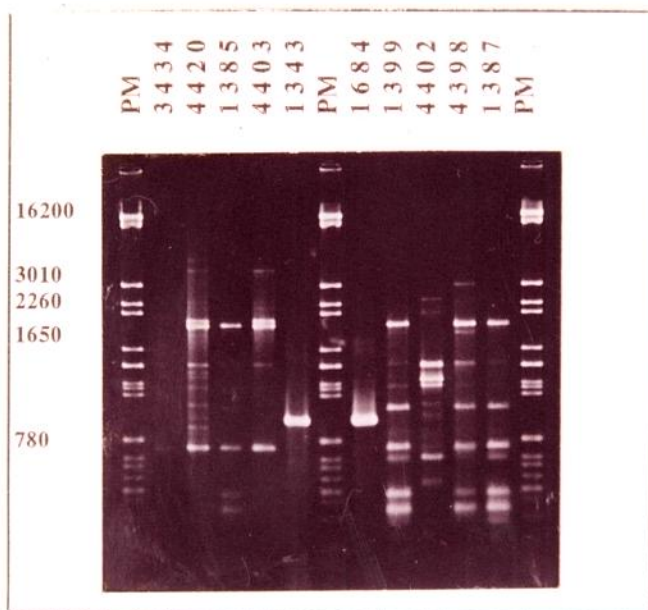


FIGURA 12: “Fingerprinting” de linhagens de *Lactobacillus* usando “primer” UBC 2 de acordo com técnica de RAPD. PM = Padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com enzima de restrição *Bgl* I).

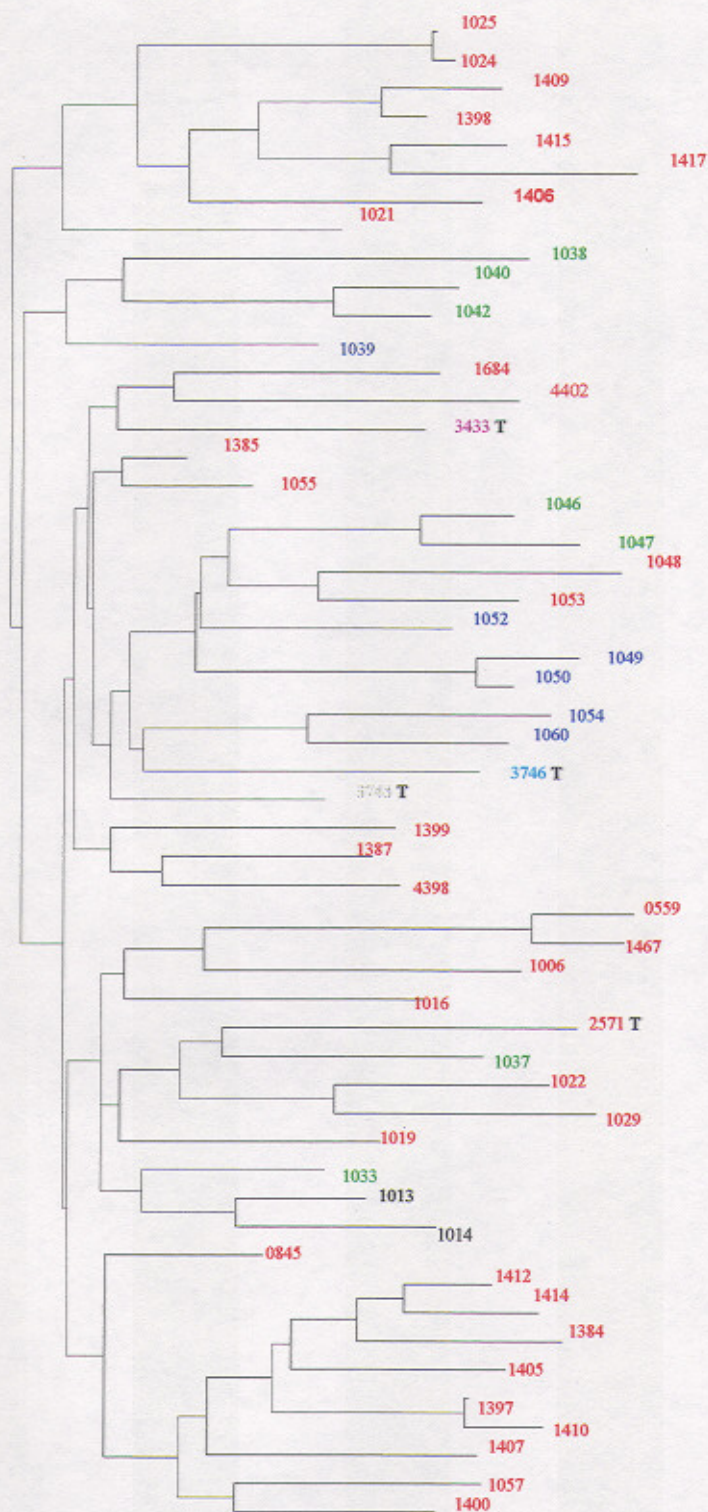


FIGURA 13: Dendrograma de linhagens de *Lactobacillus* de acordo com a técnica de RAPD usando “primer” UBC 2 e UBC 4.

L. fermentum *L. fermentum/L. reuteri*
L. fermentum/L. reuteri/L. brevis/L. buchneri *Lactobacillus* sp.
L. reuteri^T *L. brevis*^T *L. buchneri*^T

5. CONCLUSÕES

As 59 linhagens analisadas apresentaram grande diversidade em relação ao metabolismo de carboidratos analisados através do sistema API 50 CHL, e também em relação aos “fingerprintings” obtidos através da técnica de RAPD.

Os perfis de RAPD obtidos com os “primers” UBC 2 e UBC 4 foram diferentes para cada linhagem.

Observou-se a formação de grupos de linhagens que apresentaram características semelhantes quando as duas técnicas (fermentação de carboidratos e RAPD) foram aplicadas. Um grupo é formado pelas linhagens de *Lactobacillus* CCT 1049, 1050, 1052, 1054 e 1060; outro grupo é formado pelas linhagens de CCT 1412, 1414, 1384, 1405, 1397, 1410, 1407, 1057 e 1400; e um outro grupo é formado pelas linhagens de CCT 1024, 1025, 1409, 1398, 1415, 1417 e 1406.

Os grupos de microrganismos observados representam grupos importantes de *Lactobacillus* contaminantes de fermentação alcoólica e podem servir como seus representantes em processos de fermentação alcoólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABED, Y.; DAVIN, A.; CHARREL, R. N.; BOLLET, C. & MICCO, P. D. E. Variation of RAPD-fingerprint patterns using different DNA-extraction methods with Gram-positive bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **11**: 238-239. 1995.
2. APOSTOL, B. L. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. **Theoretical and Applied Genetics**, **86**: 991-1000. 1993.
3. AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. SALMINEN, S. & VON WRIGHT, A, eds. **Lactic Acid Bacteria**. 1993
4. BARBUT, F.; MARIO, N.; DELMÉE, M.; GOZIAN, J. & PETIT, J. Genomic fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates by using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **FEMS Microbiology Letters**, **114**: 161-166. 1993.
5. BARRE, P. Taxonomie numérique de lactobacilles isolés du vin. **Archives fur Mikrobiologie**, **68**: 74-86. 1969.
6. BASSAM, B. J., CAETANO-ANOLLÉS, G. & GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting of bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, **38**: 70-76. 1992.
7. BAYA, A. M.; TORANZO, A. E.; LUPIANI, B.; L, T.; ROBERSON, B. S. & HETRICK, F. M. Biochemical and sorological characterization of *Arnobacterium* spp. Isolated from Farmed and Natural Populations of Striped Bass and Catfish. **Applied and Environmental Microbiology**, **57**: 3114-3120. 1991.
8. BORCH, E. & MOLIN, G. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. **Antonie van Leeuwenhoek**, **54**: 301-323. 1988.
9. BOTTAZZI, V. An Introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. **Biochimie**, **70**: 303-315. 1988.
10. BROUSSEAU, R.; SAINT-ONGE, A.; PREFONTAINE, G.; MASSON, L. & CABANA, J. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. **Applied and Environmental Microbiology**, **59**: 114-119.

11. BRYA-JONES, G. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food**, Section II, 165-175. CARR *et alii.* eds., Academic Press, London. 1975.
12. CANCELLA, M. R.; POWELL, I. B.; HILLIER, A. J. & DAVIDSON, B. E. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. **Applied and Environmental Microbiology**, **58**: 1772-1775. 1992.
13. CASTELLASS, I.; VEKRIS, A. and DESCHAMPS, A. M. Elaboration of strain specific probe for probiotic lactobacilli. **FEMS Microbiology Reviews**, **12**: 153. 1993.
14. CHACHATY, E.; SAULNIER, P.; MARTIN, A.; MARIO, N. & ANDREMONT, A. Comparison of ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA for typing *Clostridium difficile* strains. **FEMS Microbiology Letters**, **122**: 61-68. 1994.
15. COUTINHO, H. L. C. Studies of bradyrhizobia from the brazilian cerrados. Thesis of PhD. University of Bristol, England. 1993.
16. CZAJKA, J.; BSAT, N.; PIANI, M.; RUSS, W.; SULTANA, K.; WIEDMANN, M.; WHITAKER, R. & BATT, C. A. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, **59**: 304-308. 1993.
17. CZAJKA, J. & BATT, C. A. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 1280-1287. 1994.
18. DeMAN, J. C.; ROGOSA, M. & SHARPE, M. E. A medium for cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, **23**: 130-135. 1960.
19. DICKS, L. M. T. & VAN VUUREN, H. J. J. Identification and physiological characteristics of heterofermentative strains of *Lactobacillus* from South African red wines. **Journal of Applied Bacteriology**, **64**: 505-513. 1988.
20. DUNCAN, C. L. & COLMER, A. R. Coliforms associated with sugar cane plants and juices. **Applied Microbiology**, **12**: 173-177. 1964.
21. DYKES, G. A. & HOLY, A. VON. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. **Letters in Applied Microbiology**, **19**: 63-66. 1994b.

22. DYKES, G. A.; BRITZ, T. J. & HOLY, A. VON. Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged vienna sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, **76**: 246-252. 1994a.
23. FARBER, J. M. & ADDISON, C. J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, **77**: 242-250. 1994.
24. GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Tese de PhD, Universidade Estadual de Campinas. 1989.
25. GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J.; ROSA, F. LA & VINCENZI, S. DE. Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy. **Italian of Food Science**, **1**: 85-94. 1994.
26. GOODFELLOW, M. ; JONES, D. & PRIEST, F. G. eds. **Computer -Assisted Bacterial Systematics**. Academic Press, London. 1985.
27. GRANT, I. R. & PATTERSON, M. F. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria isolated from irradiated pork and chicken packaged under various gas atmospheres. **Journal of Applied Bacteriology**, **70**: 302-307. 1991.
28. HAUSER, M. M. & SMITH, R. E. The characterization of lactobacilli from cheddar cheese. II. A numerical analysis of the data by means of an electronic computer. **Canadian Journal of Microbiology**, **10**: 757-762. 1964.
29. HASTINGS, J. W. & HOLZAPFEL, W. H. Numerical taxonomy of lactobacilli surviving radurization of meat. **International Journal of Food Microbiology**, **4**: 33-49. 1987.
30. HOLY, A. V.; CLOETE, T. E. & HOLZAPFEL, W. H. Quantification and characterization of microbial populations associated with spoiled, vacuum-packed Vienna sausages. **Food Microbiology**, **8**: 95-104. 1991.
31. INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, London, UK. 1990.
32. ISON, R. W. A revised method for the application of API 50 CH carbohydrate kits to yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, **4**: 9-11. 1987.
33. JAYARAO, B. M.; DORÉ JR, J. J. E.; BAUMBACH, G. A.; MATTHEWS, K. R. & OLIVER, S. P. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length

- polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, **29**: 2774-2778. 1991.
34. JAYARAO, B. M. & OLIVER, S. P. Polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine milk. **Journal of Food Protection**, **57**: 240-245, 248. 1994.
 35. JENSEN, K. A. & EDWARDS, C. G. Modification of the API Rapid CH system for characterization of *Leuconostoc oenos*. **American Journal for Enology and Viticulture**, **42**: 274-277. 1991.
 36. JEUNE, C. L. & LONVAUD-FUNEL, A. *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus brevis* DNA analysis by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). **Food Microbiology**, **11**: 195-202. 1994.
 37. JOHANSSON, M.; SANI, A.; LÖNNER, C. & MOLIN, G. Phenotypically based taxonomy using API 50 CH of lactobacilli from nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. **International Journal of Food Microbiology**, **25**: 159-168. 1995.
 38. KAGERMEIER-CALLAWAY, A. S. & LAUER, E. *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 is the senior synonym for *Lactobacillus bavaricus* Stetter and Stetter 1980. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **45**: 398-399. 1995.
 39. KANDLER, O. & WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. & HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore. 1986.
 40. KHETARPAUL, N. & CHAUHAN, B. M. Effect of fermentation by pure cultures of yeasts and lactobacilli on the available carbohydrate content of pearl millet. **Food Chemistry**, **36**: 287-293. 1990a.
 41. KHETARPAUL, N. & CHAUHAN, B. M. Effect of germination and fermentation on available carbohydrate content of pearl millet. **Food Chemistry**, **38**: 21-26. 1990b.
 42. KOTZEKIDOU, P. & ROUKAS T. Characterization and distribution of lactobacilli during lactic fermentation of Okra (*Hibiscus esculentus*). **Journal of Food Science**, **51**: 623-625. 1986.
 43. LABAN, P.; FAVRE, C. & LARPENT, J. P. Lactobacilli isolated from French saucisson (taxonomic study). **Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde**,

44. LEE, B. H. & SIMARD, R. E. Three systems for biochemical characterization of lactobacilli associated with meat spoilage. **Journal of Food Protection**, **47**: 937-942. 1984.
45. Le JEUNE, C. & LONVAUD-FUNEL, A. *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus brevis* DNA analysis by restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Food Microbiology**, **11**: 195-202. 1994.
46. LOGAN, N. A. **Bacterial systematics**. Blackwell Scientific Publications. 1994.
47. MACKEY, T.; LEJEUNE, V.; JANSSENS, M. & WAUTERS, G. Identification of vancomycin-resistant lactic bacteria isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, **31**: 2499-2501. 1993.
48. MÄKELÄ, P.; SCHILLINGER, U.; KORKEALA, H. & HOLZAPFEL, W. H. Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, **16**: 167-172. 1992.
49. MANACHINI, P. L. & PARINI, C. DNA restriction endonuclease cleavage patterns, DNA sequence similarity and phenotypical characteristics in some strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus jugurti*. **Antonie van Leeuwenhoek**, **49**: 143-152. 1983.
50. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. (eds.). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
51. MAYEUX, P. A. **Some studies on the microbial flora of sugar cane**. M. S. Thesis, Louisiana State University. Citado por TILBURY (1975). 1960.
52. MAZURIER, S.; GIESSEN, A. VAN DE; HEUVELMAN, K. & WERNARS, K. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. **Letters in Applied Microbiology**, **14**: 260-262. 1992.
53. MCMILLIN, D. E. & MULDROW, L. L. Typing of toxic strains of *Clostridium difficile* using DNA fingerprints generated with arbitrary polymerase chain reaction primers. **FEMS Microbiology Letters**, **92**: 5-10. 1992.

54. MICHELI, M. R.; BOVA, R.; PASCALE, E. & D'AMBROSIO, E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research*, **22**: 1921-1922. 1994.
55. MITEVA, V. I.; ABADJIEVA, A. N. & STEFANOVA, T. T. M13 DNA fingerprinting, a new tool for classification and identification of *Lactobacillus* spp. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**: 349-354. 1992.
56. MOLIN, G.; JEPSSON, B.; JOHANSSON, M. L.; AHRNÉ, S.; NOBAEK, S.; STÅHL, M. & BENGMARK, S. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**: 314-323. 1993.
57. NAITO, S.; HAYASHIDANI, H.; KANEKO, K.; OGAWA, M. & BENNO, Y. Development of intestinal lactobacilli in normal piglets. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**: 230-236. 1995.
58. NIEDERHAUSER, C.; HÖFELEIN, C.; ALLMANN, M.; BURKHALTER, P.; LÜTHY, J. & CANDRIAN, U. Random amplification of polymorphic bacterial DNA: evaluation of 11 oligonucleotides and application to food contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, **77**: 574-582. 1994.
59. OLIVA NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada.** Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 1990.
60. PARDO, I. & ZUÑIGA, M. Lactic acid bacteria in spanish red rosé and white musts and wines under cellar conditions. *Journal of Food Science*, **57**: 392-395, 405. 1992.
61. POT, B.; HERTEL, C.; LUDWIG, W.; DESCHEEMAEKE, P.; KERSTERS, K. & SCHLEIFER, K-H. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *Journal of General Microbiology*, **139**: 513-517. 1993.
62. PRIEST, F. G. & BARBOUR, E. A. Numerical taxonomy of lactic acid bacteria and some related taxa. In: GOODFELLOW, M. *et alii.*, eds. **Computer Assisted Bacterial Systematics**. London, Academic Press, 1985, p. 137-164.
63. PRIEST, F. & AUSTIN, B. **Modern Bacterial Taxonomy**. 2nd. ed. Chapman & Hall. 1993.

64. RASMUSSEN, H. N.; OLSEN, J. E. & RASMUSSEN, O. F. RAPD analysis of *Yersinia enterocolitica*. **Letters in Applied Microbiology**, **19**: 359-362. 1994.
65. RODTONG, S. & TANNOCK, G. W. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. **Applied and Environmental Microbiology**, **59**: 3480-3484. 1993.
66. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory. 1989.
67. SAMELIS, J.; MAIROGENAKIS, F. & METAXOPOULOS, J. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami. **International Journal of Food Microbiology**, **23**: 179-196. 1994.
68. SANZ, B.; SELGAS, D.; PAREJO, I. & ORDÓÑEZ, J. A. Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, **6**: 199-205. 1988.
69. SANDERY, M.; COBLE, J. & MCKERSIE-DONNOLLEY. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiling of *Legionella pneumophila*. **Letters in Applied Microbiology**, **19**: 184-187. 1994.
70. SCHMIDT, T. M.; PACE, B. & PACE, N. R. Detection of DNA contamination in *Taq* polymerase. **BioTechniques**, **11**: 176-177. 1991.
71. SHARPE, M. The genus *Lactobacillus*. p. 1653-1679. In: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed). **The Prokaryotes**. Springer-Verlag, Berlin. 1981.
72. SHAW, B. G. & HARDING, C. D. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. **Journal of Applied Bacteriology**, **56**: 25-40. 1984.
73. SILVA, N. **Influência do Resfriamento em Torre sobre a Microbiota do Caldo de Cana no Processo de Produção de Alcool**. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 1988.
74. SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco. Citado por Goodfellow *et alii*. 1985.
75. SOKAL, R. R. & MICHENER, C. D. A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, **38**: 1409-1438. 1958.
76. STACKEBRANDT, E. & TEUBER, M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. **Biochimie**, **70**: 317-324. 1988.

77. STÅHL, M.; MOLIN, G.; PERSSON, A.; AHRNÉ, S. & STÅHL, S. Restriction endonuclease patterns and multivariate analysis as a classification tool for *Lactobacillus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **40**: 189-193. 1990.
78. STÅHL, M.; PETTERSSON, B.; MOLIN, G.; UHLEN, M. & AHRNE, S. Restriction fragment length polymorphism of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, originating from intestinal mucosa, based on 16S rRNA genes. **Systematic and Applied Microbiology**, **17**: 108-115. 1994b.
79. STÅHL, M. & MOLIN, G. Classification of *Lactobacillus reuteri* by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **44**: 9-14. 1994a.
80. TAKIZAWA, S.; KOJIMA, S.; TAMURA, S.; FUJINAGA, S.; BENNO, Y. & NAKASE, T. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **44**: 435-439. 1994.
81. TALARICO, T. L.; AXELSSON, L. T.; NOVOTNY, J.; FIUZAT, M. & DOBROGOSZ, W. J. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri* : Purification of 1,3-Propanediol:NAD⁺ Oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**: 943-948. 1990.
82. TANNOCK, G. W.; FULLER, R. & PEDERSEN, K. *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**: 1310-1316. 1990.
83. TANNOCK, G. W.; MCCONNELL, M. A. & FULLER, R. A note on the use of a plasmid as a DNA probe in the detection of a *Lactobacillus fermentum* strain in porcine stomach contents. **Journal of Applied Bacteriology**, **73**: 60-62. 1992.
84. TILBURY, R. H. Biodeterioration of harvested sugar cane. In: WALTERS & ELPHIC, eds. **Biodeterioration of Materials**. Elsevier, Amsterdam, p. 717-730. 1968.
85. TILBURY, R. H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CARR, J. G. *et alii*, eds. **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food**. London, Academic Press, p. 177-191. 1975.
86. TOWNER, K. J. & COCKAYNE, A. **Molecular methods for microbial identification and typing**. Chapman & Hall, London. 1993.

87. VOGEL, R. F.; BÖCKER, G.; STOLZ, P.; EHRMANN, M.; FANTA, D.; LUDWIG, W.; POT, B.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K. H. & HAMMES, W. P. Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **44**: 223-229. 1993.
88. WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 6531-6535. 1990.
89. WELSH, J. & McCLELLAND. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 24. 1990.
90. WOODBURN, M. A.; YOUSTEN, A. A. & HILU, K. H. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **45**: 212-217. 1995.
91. YOUNG, A. & BLAKESLEY, R. Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. **Focus**, **13**: 13. 1991.