SCREENING DE PRIMERS PARA DETECÇÃO DE LACTOBACILLUS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL EM PROBIÓTICOS E PRODUTOS LÁCTEOS

ANDRESSA MOREIRA DE SOUZA

RESUMO

A etapa de desenho de primers é essencial para técnica de PCR em tempo real, uma vez que, características como: comprimento de primer, temperatura de melting (Tm), temperatura de anelamento, tamanho de amplicon e percentual de conteúdo CG determinam a especificidade do primer. Dessa forma, nesse estudo para detecção de *Lactobacillus* em produtos lácteos e probióticos, foram selecionados primers específicos para o gênero *Lactobacillus* desenhados a partir de regiões de identidade dentro da sequência de DNA ribossômico 16S (rDNA) de uma ampla diversidade de *Lactobacillus* spp., para definir com mais precisão a diversidade de *Lactobacillus* encontrados nestes produtos e detectar as principais espécies em relação à carga total de *Lactobacillus* por PCR em tempo real. Embora o consumo microrganismos ocorra há milhares de anos, apenas no século XX pesquisas científicas passaram a ser realizadas a fim de determinar os reais benefícios de produtos lácteos e fórmulas de probióticos. A maioria dos microrganismos probióticos são bactérias do ácido lático, Gram-positivo, não esporulantes e são definidos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, de acordo com a quantidade administrada. As bactérias do ácido lático são um grupo microrganismos de grande diversidade taxonômica, e sendo assim, deve-se buscar a identificação inequívoca antes da seleção final de um microrganismo eleito à probiótico. A identificação de bactérias do ácido lático por métodos fenotípicos é morosa, sendo necessários, inúmeros testes para determinar uma linhagem de *Lactobacillus* ao nível de espécie, além das divergências na identificação. Dessa forma, técnicas moleculares tem ganhado espaço, na identificação inequívoca e ágil de gêneros de bactérias do ácido lático. A seleção de oligonucleotídeos, deste trabalho, orienta a escolha de primers para detectar e distinguir espécies de *Lactobacillus*. Espécies como, por exemplo, *Lactobacillus casei/paracasei e Lactobacillus rhamnosus* são extremamente semelhantes, o que causa muito erro de identificação, mas os primers selecionados neste trabalho distinguem perfeitamente essas espécies, como observado na tabela 5, com o auxílio dos controles positivos.

Palavras-chave: PCR - *real time*; bactérias lácteas; oligonucleotídeos; formulações lácteas; DNA alvo.

1 INTRODUÇÃO

Algumas bactérias do ácido lático são utilizadas como probióticos, os quais são compostos por microrganismos vivos, que ao serem ingeridos em quantitativos ideais, agem inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos, equilibrando a microbiota intestinal, através de ação antagônica, exercendo efeitos benéficos ao organismo do hospedeiro (FELIS & DELLAGLIO, 2007; LEBEER *et al.,*2008; FREITAS, RABELO,WATANABE, 2014). O

DOI: 10.51189/conbracib2023/19242

Lactobacillus é um dos principais gêneros de microrganismos vivos, sendo então amplamente utilizado como probiótico. Os benefícios de um probiótico são caracterizados pela observação do comportamento da linhagem da bactéria, os quais necessitam atender parâmetros funcionais, tecnológicos e de segurança, na ação contra patógenos.

A microbiota intestinal é naturalmente composta por uma diversidade de bactérias, dentre os quais, o gênero *Lactobacillus* é um dos principais, e cuja identificação das espécies, por caracterização fisiológicas e bioquímicas é morosa e carregada de ambiguidade (SALANITRO *et al.*, 1978; MILES, 1993; OYARZABAL & CONNER, 1995; NOUR, 1998).

As técnicas moleculares de análise do genoma bacteriano são essenciais na diferenciação espécies, efetuando um papel importante no auxilio da classificação taxonômica (KLEIN *et al.,* 1998). O desenvolvimento de métodos de detecção baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR) tem gerado resultados positivos na identificação inequívoca e ágil das bactérias ácido lático (TORRIANI *et al.*, 1999).

As espécies de *Lactobacillus* desempenham importante papel nos processos industriais e/ou no que tange a saúde humana e animal, assim estimulando o desenvolvimento das técnicas moleculares na detecção das espécies desse gênero (CHAGNAUD *et al.,* 2001).

As bactérias do ácido lático desempenham função primordial na indústria alimentícia, através da fermentação láctica, na produção de queijo, por exemplo. Onde microrganismos atuam na acidificação do meio, propiciando a geração do acido lático, que acelera a coagulação do leite (AWAD *et al*., 2007). Tal prática substituiria o uso de agentes de coagulação enzimática, como o coalho, cuja obtenção tornou-se cada vez mais complicada e custosa (RIBEIRO, 2001).

Dentre as técnicas moleculares, várias metodologias têm sido aplicadas, como a PCR-ARDRA (análise de restrição do DNA ribossômico amplificado), a rep-PCR (reação da polimerase em cadeia com seqüências de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos) e o sequenciamento do gene 16S do rRNA (BJORKROTH *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2005; VIEGAS, 2008; LEE *et al*., 2011). No tocante aos critérios para a seleção eleitas às novas linhagens probióticas, devem ser observadas características relativas à segurança, funcionalidade e os aspectos tecnológicos das culturas que serão utilizadas na composição do produto (SAARELA *et al.*, 2000; PANCHENIAK, 2005). Os microrganismos de alguns gêneros de bactérias do ácido lático, já são mais frequentemente empregados como probióticos por serem considerados seguros (GRAS - Generally Recognized As Safe) pela FDA (Food and Drug Administration), pois há evidencias (estudos) de que não são patogênicos e nem capazes de transmitir os fatores de resistência para bactérias patogênicas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi comparar os pares de primers: *L. plantarum*, *L. casei/paracasei, L. rhamnosus, L. acidophilus* e *L. mucosae* com o par de primers de *Lactobacillus* spp. em amostras de formulações de probióticos e produtos lácteos para identificação e distinção dos mesmos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pares de primers

Foram selecionados pares de primers para detectar de *Lactobacillus* spp. - LactoF: TGGAAACAGRTGCTAATACCG e LactoR: GTCCATTGTGGAAGATTCCC; *L. casei/paracasei* - LcaseF: GCACCGAGATTCAACATGG e LcaseR: GGTTCTTGGATYTATGCGGTATTAG; *L. Rhamnosus* - LrhamF: TGCTTGCATCTTGATTTAATTTTG e LcaseR: GGTTCTTGGATYTATGCGGTATTAG;

DOI: 10.51189/conbracib2023/19242

L. acidophilus - Aci 16SI: AGCTGAACCAACAGATTCAC e 16SII: ACTACCAGGGTATCTAATCC; *L. plantarum* – Lfpr: GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT e PlanII: TTACCTAACGGTAAATGCGA; *L. mucosae* - MucB1-RVIfm: CAAGAAGCTCAAGCCATC e MucB2-RVIrm: ATCAAGCTTCTTGTAGGT (WALTER *et al.*, 2000; BYUN *et al.*, 2004; VAN DEN ABBEELE *et al.*, 2012).

2.2 Extração de DNA

Para amostras de produtos lácteos líquidos tomou-se alíquotas de 750 µL e para amostras sólidas de probióticos pesou-se 250 mg. As extrações de DNA foram conduzidas através do protocolo de extração do Kit ZymoBiomics™ DNA Miniprep cat. nº D4300, com o auxílio do equipamento Homogeneizador FastPrep-24™ na velocidade 6,5 m/s por 3 minutos.

2.3 Quantificação de DNA

Os extratos de DNA foram quantificados no equipamento Nanodrop™ One C-ND-ONEC-W.

2.4 Montagem da PCR em tempo real

Preparo de mix: SYBR™ Green PCR Master Mix , n° catálogo 4309155 (1x); forward primer (concentração final 0,8 µM); reverse primer (concentração final 0,8 µM); H_2O Milliq (1,8 µL). Utilizou-se 5,0 µL de DNA molde, previamente diluído a 10 ng/µL (50 ng) para cada reação, com volume total de 20,0 µL por reação, sendo conduzida em duplicata. Os parâmetros de termociclagem para condução da PCR em tempo real foram definidos em: ativação da polimerase (95°C/15 min); desnaturação (95°C/15 s); e anelamento (60°C/min) por 40 ciclos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para testarmos os pares de primers descritos na tabela 1, extraímos o DNA de *Lactobacillus* de amostras (cápsulas de probióticos e produtos lácteos), através do protocolo do kit comercial de extração de DNA ZymoBIOMICS D4300 (Zymo Research), o qual tem se mostrado muito eficiente para promover a lise celular e recuperação de DNA de comunidades complexas de microrganismos, como observado na tabela 2, através da quantificação de DNA e purezas indicadas pela razão A260/A280, cujo valor ideal fica entre 1,7 e 2,0 aproximadamente. Em seguida procedermos à técnica de PCR em tempo real, de acordo com a montagem da reação da tabela 3, e parâmetros de termociclagem da tabela 4. Os resultados de PCR em tempo real estão apresentados na tabela 5, sendo cada reação realizada em duplicata. A apresentação dos dados de detecção de *Lactobacillus* foi expressa por (+) ou (-) para cada par de primer testado, além do uso de controles positivos (CP) - colônias isoladas de padrões e controles negativos (CN) - água livre de DNase e RNase.

Tabela 1: Pares de primers para PCR.

DOI: 10.51189/conbracib2023/19242

Pares de Primers	Pares de Primers	Sequência 5' – 3'	Especificidade	Temperatura de anelamento (°C)
1	LactoF	TGGAAACAGRTGCTAATACCG	*Lactobacillus* spp.	62
	LactoR	GTCCATTGTGGAAGATTCCC		
2	LcaseF	GCACCGAGATTCAACATGG	*L. casei/L.paracasei*	60
	LcaseR	GGTTCTTGGATYTATGCGGTATTAG		
3	LrhamF	TGCTTGCATCTTGATTTAATTTTG	*L. rhamnosus*	62
	LcaseR	GGTTCTTGGATYTATGCGGTATTAG		
4	Aci 16SI	AGCTGAACCAACAGATTCAC	*L. acidophilus*	62
	16SII	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
5	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	*L. plantarum*	55
	PlanII	TTACCTAACGGTAAATGCGA		
6	MucB1-	CAAGAAGCTCAAGCCATC	*L. mucosae*	48
	MucB2-	ATCAAGCTTCTTGTAGGT		

Fonte: 1, 2 e 3 - Byun *et al.* (2004); 4 e 5 - Walter *et al.* (2000); e 6 - Van den Abbeele *et al.* (2012).

Tabela 2: Quantificação de DNA.

Amostra	[DNA] ng/µL	Razão A260/A280
Leite fermentado 1	69,9	1,51
Leite fermentado 2	87,0	1,49
Preparado lácteo 1	96,4	1,64
Cápsula probiótico 1	23,9	1,94
Cápsula probiótico 2	20,0	1,96
Cápsula probiótico 3	103,6	1,89
Preparado lácteo 2	111,1	2,05
Sachê probiótico	9,5	2,16

Fonte: Embrapa Agroindústria de Alimentos – Laboratório de diagnóstico molecular.

Tabela 3: Preparo de placa para PCR em tempo real.

Componentes	Volume por reação	Concentração final
SYBR™ Green PCR Master Mix (2x)	10,0 µL	1x
Forward primer 10 µM	1,6 µL	800 nM
Reverse primer 10 µM	1,6 µL	800 nM
H_2O Milliq	1,8 µL	-
DNA molde (10 ng/µL)	5,0 µL	50 ng
Volume total	20,0 µL	-

Fonte: Embrapa Agroindústria de Alimentos – Laboratório de diagnóstico molecular.

Tabela 4: Parâmetros de termociclagem para condução da PCR em tempo real.

Parâmetros	Ativação da Polimerase	PCR (40 ciclos)	
		Desnaturação	Anelamento/ extensão
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tempo (mm:ss)	15:00	00:15	01:00

Fonte: Equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR.

DOI: 10.51189/conbracib2023/19242

Tabela 5: Especificidade de primers para detecção de bactérias por PCR

Espécies	Especificidade do par de primers para detecção de bactérias					
	Lactobacillus spp.	*L. plantarum*	*L. casei/paracasei*	*L. rhamnosus*	*L. mucosae*	*L. acidophilus*
Pares de primers	Lacto F	Lfpr	Lcase F	Lrham F	Muc B1-RVIfm	Aci 16SI
	Lacto R	Plan II	Lcase R	Lcase R	Muc B2-RVIrm	16SII
Amostras						
Leite fermentado 1	+	-	+	-	-	-
Leite fermentado 2	+	-	+	-	-	-
Preparado lácteo 1	+	+	+	+	-	-
Cápsula probiótico 1	+	-	-	-	-	-
Cápsula probiótico 2	+	-	-	-	-	-
Cápsula probiótico 3	+	-	-	-	-	+
Preparado lácteo 2	+	+	-	+	+	-
Sachê probiótico	+	-	+	+	-	+
CP 1 *L. plantarum*	+	+	-	-	+	-
CP 2 *L. paracasei*	+	-	+	-	-	-
CP3 *L. rhamnosus*	+	-	-	+	-	-
CN 1	-	-	-	-	-	-
CN 2	-	-	-	-	-	-

Fonte: Embrapa Agroindústria de Alimentos – Laboratório de diagnóstico molecular.

O par de primers para *L. mucosae* necessita de mais testes com outras amostras e/ou com algum padrão específico de *L. mucosae*, uma vez que, amplificou o CP 1 de *L. plantarum*. Os demais pares de primers apresentaram comportamento específico perante os CP's testados.

4 CONCLUSÃO

O estudo possibilitou avaliar os pares de primers para detecção de diferentes espécies de *Lactobacillus*, em formulações de probióticos, propiciando identificação específica. Conforme observado nos resultados, conclui-se que o par de primers LactoF/LactoR é um par não específico, logo, não serve para distinguir espécie de *Lactobacillus*, enquanto o par de primers Muc B1-RVIfm/ Muc B2-RVIrm necessita de mais testes para comprovar se o mesmo teria ou não especificidade.

REFERÊNCIAS

AWAD, S.; AHME, N.; SODA, M. Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras

cheese ripening and flavour development. **Food Chemistry**, n. 104, p. 1192–1199, 2007.

BJORKROTH, K. J.; SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B.; HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 141-148, 2002.

BYUN, R.; NADKARNI, M.A.; CHHOUR, K.L.; MARTIN, F.E.; JACQUES, N.A.; HUNTER, N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. **J Clin Microbiol.** 2004 Jul;42(7):3128-36. doi: 10.1128/JCM.42.7.3128-3136.2004.

CHAGNAUD, P.; MACHINIS, K.; COUTTE, L.A. *et al.* Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. **J. Microbiol. Methods**, v.44, p.139-148, 2001.

FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Curr. Issues **Intest. Microbiol**. v. 8, p. 44-61, 2007.

FREITAS, E.D; RABELLO, C.B.V; WATANABE, P.H. Nutrição de não ruminantes. **FUNEP**, Jaboticabal, p.487-496, 2014.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C. *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. **Food Microbiol**, v.41, p.103-125, 1998.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of *lactobacilli* supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, p. 728-764, 2008.

LEE, C. M.; SIEO, C. C.; CHEAH, Y-K.; ABDULLAH, N.; HO, Y. W. Discrimination of probiotic *Lactobacillus* strains for poutry by repetitive sequenced-based PCR fingerprinting. **Journal of the Science of food and Agricultural**, v. 10, p 1-7, 2011.

MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. *In:* ALTECH BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 1993, Florida. **Proceedings Florida**, 1993. p.133-150.

MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**, v. 5, p. 1-9, 2005.

NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of *lactobacilli*: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. **Res. Microbiol**, v.149, p.433-448, 1998.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos Tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2002.

OYARZABAL, O.A.; CONNER, D.E. In vitro fructoolisaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. Poult. Sci., v.74, p.1418-1425, 1995. SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. PROBIOTIC bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

PANCHENIAK, E. F. R. **Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos.** 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RIBEIRO E. P. Biotecnologia Industrial. Biotecnologia na produção de alimentos. *In*: **AQUARONE *et al.* (Org.)** Vol. 4. São Paulo, Editorial Edgar Blücher Ltda, 2001.

SALANITRO, J.P.; BLAKE, I.G.; MUIRHEAD, P.A. *et al.* Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. **Appl. Environ. Microbiol**, v.35, p.782-790, 1978.

TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; DELLAGLIO, F. Use of PCR- Based Methods for Rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *L. Delbrueckii* subsp. *Lactis*. **J. Food Prot,** v.65, p.4351-4356, 1999.

VAN DEN ABBEELE, P.; ROOS, S.; EECKHAUT, V.; MACKENZIE, D.A.; DERDE, M.; VERSTRAETE, W.; MARZORATI, M.; POSSEMIERS, S.; VANHOECKE, B.; VAN IMMERSEEL, F.; VAN DE WIELE, T. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by *lactobacilli*. **Microb Biotechnol**. 2012 Jan;5(1):106-15. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00308.x. Epub 2011 Oct 12. PMID: 21989255; PMCID: PMC3815277.

VIEGAS, R. P. **Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo**: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

WALTER, J.; TANNOCK, G.W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; LOACH, D.M.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. **Appl Environ Microbiol**. 2000;**66**:297–303. doi: 10.1128/AEM.66.1.297-303.2000.