

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis presentada como parte de los requisitos de la
Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de
Doctor en Ciencias Biológicas.

“Bacteriofagos de *Lactobacillus casei/paracasei*.
Caracterización y estudio de la fagorresistencia”.

Lic. María Luján Capra

Director: Dr. Jorge A. Reinheimer.
Co-directora: Dra. Andrea del L. Quiberoni
Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)
Facultad de Ingeniería Química (UNL)

2007

MIEMBROS DEL JURADO DESIGNADOS PARA ACTUAR
EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

TITULARES:

DRA. GRACIELA LILIANA DE ANTONI (U.N.L.P.)

DRA. GRACIELA MARIA FONT (CERELA - CONICET)

DR. JUAN DANIEL CLAUS (U.N.L.)

SUPLENTE:

DRA. MARÍA CRISTINA LURÁ (U.N.L.)

TRABAJOS PUBLICADOS

Capra, M.L.; Quiberoni, A. del L. y Reinheimer, J.A. (2004). Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages". *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 499 – 504.

Suárez, V.; Quiberoni, A.; Binetti, A.; Guglielmotti, D.; **Capra, M.L.** y Reinheimer, J. (2004). Tratamientos térmicos y químicos para prevenir infecciones por fagos de bacterias lácticas". *Rev. Arg. de Lactología* 22: 55 – 76.

Suárez, V.; Binetti, A.; Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. y **Capra, M.L.** (2005). Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos. Sección III: Infecciones fágicas. Capítulo 1: Tratamientos térmicos y químicos para la inactivación de fagos. (Reinheimer, L. y Zalazar, C.). Centro de Publicaciones - Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina (en prensa).

Capra, M.L.; Quiberoni, A. del L. y Reinheimer, J.A. (2006). Phages of *Lactobacillus casei/paracasei*. Response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *J. Appl. Microbiol.* 100: 334 – 342.

Capra, M.L.; Quiberoni, A. del L.; Ackermann, H.-W.; Moineau, S. y Reinheimer, J.A. (2006). Characterization of a New Virulent Phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*. *J. Dairy Sci.* 89 (7): 2414 – 2423.

Capra, M.L.; Quiberoni, A.L.; Reinheimer, J.A. (2006). Infecciones fágicas en bacterias probióticas (*Lactobacillus casei / paracasei*). Libro de Actas del X Congreso CYTAL Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos - 1er Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías (Editado por Ciencia Actual, Buenos Aires, Argentina, ISBN 987-22165-1-7), Vol. 1, Tomo V, pág. 1651 – 1659.

a mi Familia...

Agradecimientos...

Al Dr. Jorge Reinheimer, por abrirme las puertas que me permitieron formar parte de su grupo de trabajo. Por la formación y las oportunidades. Por el ejemplo.

A la Dra. Andrea Quiberoni, por guiarme y acompañarme en este largo camino. Por las horas de charla y discusión de resultados, por su paciencia y su permanente disposición. Por sus enseñanzas, que me hicieron crecer.

A Domenico, por animarme a ver el problema desde la otra vereda.

*A la Dra. Ruzal, por facilitarme la cepa de *Lb. casei* ATCC 393 y el fago ϕ 393/A2.*

A la Dra. Hynes y a la Bioq. Bude Ugarte, por las cepas de NSLAB empleadas en este trabajo.

Al Dr. Moineau y al Dr. Ackermann, por sus sugerencias y su apoyo.

A todos mis compañeros del INLAIN, especialmente a Andrea, Daniela, Viviana y Carina, por tantos momentos compartidos. También a Emilio, Mario, Mariana, Diego, Ana, Mariángeles, Gabriel y Patricia.

A todo el INLAIN por brindar un maravilloso y cálido ambiente de trabajo.

A Fabian, por su apoyo incondicional, por ser mi sostén permanente y por su paciencia.

A mis solcitos, Nicolás y Avril, por iluminar cada día de mi vida y hacer más llevadero el esfuerzo.

A mis padres y hermanos, también los del corazón, por señalarme el camino correcto y sostener siempre mis espaldas.

A todos los que amo y me acompañaron a lo largo de estos cinco años...

INDICE

Abreviaturas y símbolos.....	i
Resumen.....	1
Summary.....	6
INTRODUCCIÓN.....	10
I Probióticos.....	10
I.1 Generalidades.....	10
I.1.1 Microflora intestinal y bacterioterapia.....	10
Bacterioterapia.....	11
I.1.2 Evolución del término probiótico	12
I.1.3 Otros términos relacionados.....	14
I.1.4 Microorganismos empleados como probióticos.....	15
I.2 Selección y usos de microorganismos probióticos.....	15
I.2.1 Consideraciones generales.....	15
I.2.2 Características probióticas.....	19
I.2.3 Aspectos tecnológicos.....	24
I.2.4 Perspectivas futuras.....	26
I.2.5 Empleo de probióticos en el mundo.....	27
I.2.6 Empleo de probióticos en Argentina.....	29
I.3 <i>Lactobacillus casei</i> como microorganismo probiótico.....	32
I.3.1 Características generales.....	32
I.3.2 Lactobacilos del grupo <i>casei</i> en quesos.....	34
I.3.3 Lactobacilos del grupo <i>casei</i> en leches fermentadas.....	35
I.3.4 <i>Lactobacillus casei</i> / <i>paracasei</i> como microorganismo probiótico.....	37
II Bacteriofagos.....	41
II.1 Generalidades.....	41
II.2 Estructura de los bacteriofagos.....	43
II.3 Bacteriofagos de bacterias lácticas.....	45
II.3.1 Caracterización de bacteriofagos de bacterias lácticas.....	47
II.3.2 Ciclos de multiplicación fágica.....	51
II.3.2.1 Ciclo lítico de fagos – crecimiento vegetativo.....	51
II.3.2.2 Lisogenia.....	55
II.3.3 Mecanismos de fagorresistencia en bacterias lácticas.....	57
II.3.4 Pared celular.....	63
II.3.5 Estrategias para el control de bacteriofagos.....	69
Cultivos iniciadores.....	70
Limitación de las etapas de propagación de los cultivos.....	71
Medios inhibidores de fagos.....	71
Tratamientos térmicos.....	72
Rotación de cultivos.....	72
Higiene de la planta.....	73

Diseño de la planta.....	74
Cepas insensibles a bacteriofagos (cepas salvajes).....	75
Obtención de cepas modificadas con fagoresistencia mejorada	76
III Bacteriofagos de <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	82
III.1 Fagos aislados hasta el momento.....	82
III.2 Importancia industrial de la infección fágica en bacterias probióticas	85
Objetivo general	87
Objetivos particulares:.....	87
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
II.1 Cepas.....	88
Conservación y reactivación de las cepas	90
II.2 Bacteriofagos.....	90
II.3 Metodología general empleada para el estudio de fagos de <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	91
II.3.1 Conservación de los fagos.....	91
II.3.2 Propagación de los fagos	91
II.3.3 Titulación de fagos.....	92
II.4 Aislamiento de los bacteriofagos autóctonos de <i>Lactobacillus paracasei</i> (MLC-Ai).....	93
II.4.1 Muestras	93
II.4.2 Tratamiento de las muestras. Búsqueda de fagos	93
II.4.3 Test de Turbidez.....	94
II.4.4 Spot Test.....	94
II.4.5 Aislamiento y purificación de los fagos	95
II.5 Caracterización de los bacteriofagos.....	95
II.5.1.1 Microscopía electrónica.....	95
II.5.1.2 Análisis de restricción de los genomas fágicos	96
II.5.1.3 Estudio de la diversidad genética para los fagos aislados en Argentina.....	97
II.5.1.4 Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación.....	97
II.5.1.5 Viabilidad a distintos valores de pH.....	98
II.5.1.6 Influencia de sacarosa y sales inorgánicas sobre la viabilidad de los fagos.....	98
II.5.1.7 Resistencia térmica y química de los fagos.....	98
Cinéticas de muerte térmica.....	98
Cinéticas de muerte química	100
II.5.2 Interacción de <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> con sus fagos específicos.....	100
II.5.2.1 Influencia de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} en el ciclo lítico de los fagos	100
Lisis en medio líquido.....	101
Formación de placas de lisis en medio agarizado	101
II.5.2.2 Determinación del espectro de huéspedes.....	101
II.5.2.3 Cinéticas de crecimiento de <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> en caldo MRS. Influencia del calcio y de la dosis infectiva.....	102
II.5.2.4 Ciclos de multiplicación fágica (<i>Burst size</i>)	103
II.5.3 Caracterización de la adsorción	104

II.5.3.1	Influencia del calcio.....	106
II.5.3.2	Influencia de la temperatura.....	106
II.5.3.3	Influencia de un tratamiento térmico sobre las células.....	107
II.5.3.4	Influencia del pH.....	107
II.5.3.5	Adsorción del fago PL-1 sobre <i>Lactobacillus paracasei</i> A.....	108
II.5.4	Estudios sobre paredes celulares.....	109
II.5.4.1	Preparación de las paredes celulares.....	109
II.5.4.2	Microtécnica de recuento bacteriano en placa.....	111
II.5.4.3	Calibración de las paredes celulares.....	111
II.5.4.4	Tratamientos selectivos sobre las paredes celulares.....	112
II.5.4.5	Tratamientos térmicos realizados sobre las paredes control.....	113
II.5.4.6	Ensayos de adsorción.....	113
II.5.4.7	Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas.....	113
II.5.4.8	Ensayos de neutralización fágica con monosacáridos.....	114
II.5.4.9	Ensayos de desorción y competencia con monosacáridos, en la adsorción de los fagos sobre las paredes celulares.....	115
II.6	Aislamiento de mutantes espontáneos fago resistentes.....	117
II.6.1	Aislamiento a partir de cultivos secundarios y de medio agarizado.....	117
	Cultivos secundarios.....	117
	A partir de medio agarizado.....	117
II.6.2	Caracterización del fenotipo de fago resistencia para los mutantes obtenidos.....	118
II.6.2.1	Confirmación de la fago resistencia.....	118
II.6.2.2	Estabilidad de la fago resistencia.....	119
II.6.2.3	Espectro de resistencia fágica de los mutantes obtenidos.....	119
II.6.3	Nuevo criterio de estabilidad para los mutantes resistentes obtenidos.....	120
III	RESULTADOS.....	121
III.1	Aislamiento de los bacteriofagos MLC-Ai.....	121
III.2	Caracterización de los fagos.....	124
III.2.1.1	Microscopía electrónica.....	124
III.2.1.2	Análisis de restricción del ADN doble cadena de los fagos.....	126
III.2.1.3	Estudio de la diversidad para los fagos aislados en Argentina (fagos MLC-Ai).....	127
III.2.1.4	Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación.....	129
III.2.1.5	Viabilidad de los bacteriofagos a distintos valores de pH.....	131
III.2.1.6	Influencia de sacarosa y sales inorgánicas sobre la viabilidad de los fagos.....	132
III.2.1.7	Resistencia térmica y química.....	133
	Cinéticas de muerte térmica.....	133
	Cinéticas de muerte química.....	137
III.2.2	Interacción de <i>Lactobacillus casei</i> / <i>paracasei</i> con sus fagos específicos.....	143
III.2.2.1	Influencia de los cationes divalentes Ca ²⁺ y Mg ²⁺ en el ciclo lítico de los fagos.....	143
III.2.2.2	Determinación del espectro de huéspedes.....	145

III.2.2.3 Cinéticas de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> / <i>paracasei</i> en caldo MRS. Influencia del calcio y de la dosis infectiva.....	147
III.2.2.4 Ciclos de multiplicación fágica (<i>Burst size</i>).....	149
III.2.3 Caracterización de la adsorción.....	150
III.2.3.1.1 Influencia del calcio.....	150
III.2.3.1.2 Influencia de la temperatura.....	151
III.2.3.1.3 Influencia de un tratamiento térmico sobre las células.....	151
III.2.3.1.4 Influencia del pH.....	152
III.2.3.2 Interacción entre <i>Lactobacillus paracasei</i> A y el fago de colección PL-1.....	154
III.2.3.2.1 Adsorción.....	154
III.2.3.2.2 Curvas de crecimiento en un paso.....	157
III.2.4 Estudios sobre paredes celulares.....	160
III.2.4.1 Ensayos de adsorción sobre paredes celulares tratadas.....	160
Tratamientos térmicos.....	160
Tratamientos químicos y enzimáticos.....	162
III.2.4.2 Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas.....	164
III.2.4.3 Ensayos de neutralización fágica con monosacáridos.....	166
III.2.4.4 Ensayos de desorción y competencia con monosacáridos, en la adsorción de los fagos sobre las paredes celulares.....	166
III.3 Aislamiento de mutantes espontáneos fago resistentes.....	168
III.3.1 Aislamiento a partir de cultivo secundario y de medio agarizado.....	168
III.3.2 Caracterización del fenotipo de fagorresistencia para los mutantes obtenidos	169
III.3.2.1 Confirmación de la fagorresistencia.....	169
III.3.2.2 Estabilidad de la fagorresistencia.....	170
III.3.2.3 Espectro de resistencia fágica de los mutantes obtenidos.....	170
III.3.3 Nuevo criterio de estabilidad para los mutantes resistentes obtenidos.....	171
IV DISCUSIÓN.....	174
V CONCLUSIONES.....	202
BIBLIOGRAFIA.....	205

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abi	Infección abortiva
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ALT	Ácido lipoteicoico
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Ácido teicoico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintrifosfato
ATU	Ácido teicurónico
BIM	Mutantes espontáneos fago resistentes (<i>bacteriophage insensitive mutants</i>)
CNRZ	<i>Centre National de la Recherche Zootechnique</i>
D.O.	Densidad óptica
ds	Días
DVS	Cultivo iniciador directo (<i>Direct vat set</i>)
ELISA	Enzimo inmuno análisis
EOP	Eficiencia de plaqueo
EPS	Exopolisacáridos
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i>
h	Horas
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
IS	Secuencia de inserción
kb	Kilobases
LcS	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota
LDR	Leche descremada reconstituida
LG	Ácido lipoglicano
min	Minutos
m.o.i.	Dosis infectiva (<i>Multiplicity of infection</i>)
NK	<i>Natural killer</i>
NSLAB	Bacterias lácticas no adicionadas con el fermento (<i>Non starter lactic acid bacteria</i>)
PCC	Pared celular control
PDRS	<i>Phage defense rotation strategy</i>
Per	<i>Phage encoded resistance</i>
PG	Peptidoglicano
PIM	Medios inhibidores de fagos (<i>phage inhibitory media</i>)
PIP	<i>Phage infection protein</i>
R/M	Restricción / Modificación
SDS	Duodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamidas en condiciones desnaturalizantes
TCA	Ácido tricloroacético
TMG	Tris – magnesio – gelatina
ufc	Unidades formadoras de colonias

ufp	Unidades formadoras de placas
UV	Ultravioleta
φ	Bacteriofago

Microorganismos

<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>St.</i>	<i>Streptococcus</i>

RESUMEN

RESUMEN

El ataque por fagos a las bacterias integrantes de los cultivos iniciadores representa una de las principales causas de problemas de acidificación en la industria láctea mundial, ocasionando serias dificultades tecnológicas y grandes pérdidas económicas. La situación es considerablemente más grave y compleja en el caso de las infecciones fágicas sobre bacterias probióticas debido a los grandes costos implicados en la adición de estos cultivos a los productos lácteos, por las características probióticas particulares únicas de una cepa, y por los costos en dinero y tiempo dispensados en investigación y desarrollo para avalar seriamente el empleo de un cultivo probiótico en un producto determinado. Recientemente, el interés en la biología de fagos que infectan bacterias probióticas se ha ido incrementando, como resultado de la diversificación e intensificación en el uso de estos microorganismos en la industria láctea fermentativa mundial. *Lactobacillus casei* / *paracasei* son de las especies probióticas más frecuentemente empleadas en la elaboración de este tipo de productos.

La caracterización inherente a los fagos, su interacción con sus cepas sensibles y el conocimiento del modo en que diferentes parámetros fisicoquímicos pueden afectar su viabilidad, es de primordial importancia al momento de llevar adelante procedimientos de control que resulten efectivos para aliviar las devastadoras consecuencias de sus ataques líticos. Para fagos de bacterias probióticas y particularmente para *Lb. casei* / *paracasei*, la información disponible es muy escasa si se compara con la existente para bacteriofagos específicos de otras bacterias lácticas.

Por todos los motivos expuestos, en este trabajo se comenzaron a estudiar fagos disponibles en la colección ATCC. Posteriormente, y en virtud de los aislamientos del primer fago de *Lb. paracasei* de Sudamérica (MLC-A) y otros sucesivos (más de 20 aislamientos realizados), la investigación se amplió utilizando estos fagos originarios de fermentaciones industriales defectuosas de una leche fermentada elaborada en nuestro país.

Con relación a las propiedades intrínsecas de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A, se realizó la caracterización molecular de sus genomas y se determinaron: morfología, viabilidad en

diferentes condiciones de almacenamiento y de suspensión y también, su termo y quimiorresistencia. Los perfiles de restricción del fago MLC-A obtenidos con *EcoRI* y *HindIII* mostraron considerables diferencias en comparación con los correspondientes a los fagos PL-1, J-1 y ϕ 393/A2, confirmando que se trata de un fago diferente. El tamaño molecular estimado para el genoma de MLC-A fue de 37 kb. Notablemente, este fago aislado en Argentina, parecería contar con un mecanismo de empaquetamiento de su ADN del tipo *pac*. Según la morfología, evidenciada por microscopía electrónica, los fagos PL-1, J-1 y MLC-A pertenecen a la Familia *Siphoviridae* (morfotipo B1, en la clasificación de Ackermann). En cuanto a las condiciones de almacenamiento de las suspensiones fágicas, se observó, en general, una tendencia a favor de la temperatura de -80°C para un mejor mantenimiento de las partículas fágicas activas. Por otra parte, los tres fagos estudiados presentaron una considerable resistencia a pH extremos, con altas viabilidades entre valores de pH de 4 y 10 (25°C) y entre 5 y 10 (37°C). En cuanto a los tratamientos térmicos y sus efectos sobre la viabilidad fágica, resulta evidente que la pasteurización no es adecuada para la completa inactivación de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A en leche. El fago MLC-A resultó notablemente más resistente (a 63°C y particularmente a 72°C) que los fagos de colección y a diferencia de éstos, cuya sensibilidad térmica no se vio influenciada por los diferentes medios de suspensión ensayados, se vio que la leche resulta un medio protector. En los tratamientos con agentes químicos, los alcoholes etanol e isopropanol fueron ineficaces, mientras que en presencia de ácido peracético las suspensiones virales de alto título de los tres fagos se inactivaron completamente en pocos minutos. Frente al hipoclorito de sodio, los fagos de colección mostraron una resistencia más elevada que el fago MLC-A, requiriéndose 800 ppm para la completa inactivación de las suspensiones de aquéllos contra 600 ppm, necesarias para este último.

La segunda parte de la caracterización contempló la interacción de los fagos con diversas cepas sensibles. En tal sentido, se estudiaron: la interacción de cationes divalentes en el ciclo lítico, el espectro de huéspedes, las cinéticas de crecimiento de cultivos infectados y los ciclos de multiplicación fágica, así como también la caracterización del proceso de adsorción y de los receptores para los fagos empleando paredes celulares. Con respecto a los

caciones divalentes, sólo el fago MLC-A fue incapaz de completar el ciclo lítico en ausencia de cationes. Su presencia fue también necesaria para el fago PL-1, pero sólo para la visualización de sus placas de lisis, no para producir la lisis del cultivo en medio líquido. En general, el calcio fue más efectivo que el magnesio para todos los sistemas estudiados. La determinación de los espectros de huéspedes para los 7 fagos investigados indicó que resultan altamente específicos frente a *Lb. casei* y *Lb. paracasei* y reveló que comparten un idéntico perfil de cepas sensibles, entre las 47 cepas empleadas. De las curvas de crecimiento en un paso, los parámetros de multiplicación fágica determinados fueron: períodos de latencia entre 5 y 90 min, *burst times* entre 120 y 140 min y *burst sizes* entre 32 y 160 ufp / centro infectivo. Se observaron notables diferencias en los parámetros correspondientes a un mismo fago sobre distintas cepas. El caso más evidente fue el sistema PL-1 / *Lb. paracasei* A, mostrando períodos de latencia y *burst* notablemente más cortos que los de los demás sistemas estudiados.

Las cinéticas de adsorción revelaron que, a excepción del fago MLC-A sobre la cepa *Lb. paracasei* A, el calcio no fue requerido para cumplir la primera etapa del ciclo lítico. Incluso, la adsorción de MLC-A sobre *Lb. casei* ATCC 27139 fue independiente de la presencia del catión, indicando que sería necesaria en alguna etapa posterior para poder culminar el ciclo. Con respecto al efecto de la temperatura de incubación, si bien para los sistemas estudiados las adsorciones se produjeron en todo el rango estudiado (0 – 50°C) con valores óptimos a 30°C, el grado de dependencia fue diferente en cada caso. En cambio, todos los sistemas estudiados mostraron diferencias significativas entre las disminuidas adsorciones sobre células tratadas y los controles sobre células que no recibieron tratamiento térmico, sugiriendo la termolabilidad de los receptores o la exigencia de viabilidad celular para rendir una adsorción exitosa. Respecto de la influencia del pH sobre la adsorción, fue altamente dependiente del sistema en evaluación, si bien en general se tuvieron tasas máximas a valores de pH entre 5 y 7. Un comportamiento atípico, en relación con los demás sistemas estudiados, fue manifestado por el fago PL-1 infectando la cepa *Lb. paracasei* A. Se requirieron de incubaciones muy prolongadas para lograr la adsorción, probablemente como consecuencia de algún tipo de modificación en los receptores, en comparación con su

cepa sensible original *Lb. paracasei* ATCC 27092, que posibilite la interacción fago-cepa aunque en una forma menos efectiva.

Resultados preliminares obtenidos por aplicación de tratamientos químicos y enzimáticos aplicados a las paredes celulares indicaron, en todos los sistemas aquí estudiados, que los receptores serían principalmente de naturaleza hidrocarbonada. El diseño de experiencias más complejas empleando L-ramnosa y D-ribosa para competir con los receptores presentes en las paredes y para desorber a los fagos previamente unidos a ellos, permitió sugerir a la L-ramnosa como un componente del receptor reconocido específicamente, tanto por los fagos de colección como por MLC-A. Para el fago autóctono MLC-A, no se descarta además, la posible participación de la D-ribosa. En otro estudio efectuado sobre paredes celulares, se investigó el tipo de unión de los fagos a las paredes purificadas, mostrando en todos los casos ausencia de desorción espontánea neta, lo cual podría también considerarse como un estado de equilibrio entre los fagos libres y los adsorbidos reversiblemente a las paredes.

Por último, se abordó el aislamiento de mutantes espontáneos fago resistentes a partir de dos cepas de *Lb. casei* / *paracasei* (A y ATCC 27139), aunque infructuosamente. Todas las variantes fago resistentes obtenidas fueron finalmente descartadas, ya que sus fenotipos fueron inestables a lo largo de sucesivos repiques. Aparentemente, para la expresión estable de resistencia frente a fagos en esta especie, sería imprescindible la presencia permanente del fago en el medio. En este aspecto, la especie presentaría un comportamiento completamente particular a comparación de otras bacterias lácticas antes estudiadas por nuestro grupo.

Si se considera la evolución desde fines de 2003, con el aislamiento del primer fago argentino específico de una cepa probiótica, hasta la actualidad, con más de 20 aislamientos realizados, se destaca que a partir de mediados de 2005 la presencia de fagos en la planta ha ido creciendo en forma progresiva y continua. El notable incremento en el número y

diversificación de muestras y en la frecuencia de los envíos para la detección de fagos, son todos indicativos de la preocupación real por parte de la industria.

Se presenta así un nuevo problema cuya resolución es compleja y difiere, en cuanto a sus particularidades y a las estrategias para enfrentarlo, respecto de los ataques fágicos sobre otras bacterias lácticas.

SUMMARY

SUMMARY

Phage attacks to dairy starters represent one of the major causes of acidification failures in the world dairy industry, producing technological difficulties and great economic losses. When referring to probiotic cultures, the situation is considerably more complex and severe, due to higher costs associated with the addition of probiotic strains, the singular characteristics of each strain and the time and money dispensed in the research and development of a determinate product. Recently, the interest for studying the biology of phages which infect probiotic bacteria has been increasing as a result of the diversification and intensification in the use of this kind of bacteria in the fermentative dairy industry. *Lactobacillus casei* and *Lb. paracasei* are within the species more frequently used for manufacturing this sort of products.

The inherent characterization of phages, its interaction with their sensitive strains and the knowledge of the influence of different physicochemical parameters on their viability, are items of major concern for the implementation of effective control strategies, which minimizes the devastating effects of its lytic attacks. Available data about probiotic bacteria phages, particularly for *Lb. casei* / *paracasei*, is scarce when comparing with phages of other lactic acid bacteria species.

Considering all this facts, studies on *Lb. casei* / *paracasei* ATCC phages were initiated in this work. Subsequently, due to the isolation of the first *Lb. paracasei* bacteriophage in Southamerica (MLC-A) and others (more than 20 isolates), the investigation was broaden by the incorporation of these phages isolated from defective industrial fermentations, during the production of a fermented milk in our country.

In relation with intrinsic properties of phages PL-1, J-1 and MLC-A, the molecular characterization of their genomes and their morphology, and viability under different stock and suspension conditions, were determined. Besides, their thermal and chemical resistances were investigated. Phage MLC-A restriction patterns with *EcoRI* and *HindIII*, showed

considerable differences with those obtained for phages PL-1, J-1 and ϕ 393/A2, confirming the isolation of a new singular phage. The molecular genome size estimated for MLC-A phage was about 37 kb. Surprisingly, this phage isolated in Argentina, seems to present a *pac* type packaging DNA mechanism. According to their morphology observed by electron microscopy, phages PL-1, J-1 and MLC-A belong to the *Siphoviridae* Family (morphotype B1, in the Ackermann classification). Studies performed to determine the effect of temperature on the preservation of high titers suspensions in phage stocks showed in general, that -80°C was the best one for this aim. In addition, the three phages showed high viabilities along a wide range of pH values, both at 25°C (pH values from 4 to 10) and at 37°C (pH values from 5 to 10). Regarding thermal treatments, it was demonstrated in all cases that pasteurization was not adequate to completely remove phage infective particles in milk suspensions. In fact, phage MLC-A proved to be considerably more resistant than PL-1 and J-1 (at 63°C and, particularly, at 72°C). The three different media tested did not show any clear influence on the viability of collection phages during thermal treatments. On the other hand, milk protected MLC-A suspensions comparing with broth MRS and buffer TMG. Results obtained after using biocides, demonstrated that alcohols (isopropanol and ethanol) were not effective, while peracetic acid was the best one for inactivating completely high titers phage suspensions in a few minutes. When sodium hypochlorite was used, PL-1 and J-1 phages showed to be more resistant than MLC-A, requiring 800 ppm for the complete inactivation, against 600 ppm needed for the latter.

To characterize the interactions between the phages and their sensitive strains, the following aspects were investigated: influence of divalent cations during the lytic cycle; host spectrum; infective culture growth kinetics; one step growth curves; effect of several factors on the adsorption process and the nature of their receptors on cell walls. It was found that only MLC-A phage was unable to complete its lytic cycle when calcium or magnesium were absent. The presence of any of those ions was also necessary for phage PL-1, but only for the visualization of lysis plaques, not to produce the culture lysis in MRS broth. Generally, calcium was more effective than magnesium for all systems tested. The host ranges for the 7 phages studied, showed that they all were highly specific for *Lb. casei* and *Lb. paracasei*

strains and revealed that they share identical sensitive spectrum. About one step growth curves, multiplication phage parameters obtained were: 5 - 90 min for latent periods; 120 - 140 min for burst times and 32 - 160 pfu / infective centers for burst sizes. Remarkable differences were observed in the parameters of a single phage on diverse sensitive strains. The most particular one was the system conformed by PL-1 and *Lb. paracasei* A.

Adsorption kinetics showed that, excepting for phage MLC-A with *Lb. paracasei* A, calcium ions were not required for achieving this first step in the lytic cycle. Moreover, the adsorption of phage MLC-A on *Lb. casei* ATCC 27139 was independent of this cation, indicating that it should be necessary at any subsequent stage for finalizing the lytic cycle. Regarding the temperature influence, adsorptions occurred at the whole range (0 - 50°C) studied with maximum values at 30°C, although each phage-strain system exhibited a particular dependency. On the contrary, all systems studied showed significant differences between the diminished adsorption rates on thermal treated cells and the control (cells that were not treated). These results suggested the existence of thermosensitive receptors or the essential requirement of cell viability to reach adsorption. The effect of pH was highly dependent of the system tested, even though maximum rates were obtained between pH values 5 and 7. An odd behavior was found for phage PL-1 when infecting *Lb. paracasei* A, since it required very long incubations to effectively adsorb. Perhaps, its receptors were modified, in comparison with the original sensitive strain *Lb. paracasei* ATCC 27092, in a way that permits phage - strain interaction while in a less productive manner.

Preliminary results obtained by the application of several chemical and enzymatic treatments on cell walls indicated that, for all systems, the major components of receptors were carbohydrates. More complex experiments designs employing L-rhamnose and D-ribose to compete with cell wall receptors and to desorb phage particles previously adsorbed to them, suggested that the former should be the principal component of the specific receptors for PL-1, J-1 and MLC-A phages. However, the probable participation of D-ribose was not discarded for the autochthonous phage. Another study carried out on cell walls, did not detected spontaneous release of phages already attached to receptors. This

probably means that phages were bound irreversibly or that they were reversible bound and an equilibrium state existed between them and free particles.

Lastly, isolation of spontaneous phage resistant mutants was undertaken for two *Lb. casei* / *paracasei* strains (A and ATCC 27139), but it was fruitless. All phage resistant variants obtained were finally eliminated, because of their instability throughout successive subcultures. Apparently, the permanent presence of phage particles in the environment was indispensable to maintain a stable expression of phage resistance. Considering this feature, these species seems to present a completely singular behavior in comparison with other lactic acid bacteria previously studied by our group.

In view of the evolution from the end of 2003, with the isolation of the first Argentinean phage specific for a probiotic strain, until now, with more than 20 isolations made, it is noteworthy the progressive and continuous presence of phages in the industrial environment. The substantial increment in number and diversity of samples, and in the demand of this kind of analysis (phage detection), are strongly indicating the genuine and rising concern respect to this issue from the industry.

The appearance of a new problem, for which the resolution is complex and different, in characteristics and strategies to face it, regarding phage attacks against other lactic acid bacteria, is presented in this study.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I PROBIÓTICOS

I.1 Generalidades

I.1.1.1 Microflora intestinal y bacterioterapia

El tracto gastrointestinal humano contiene aproximadamente 10^{14-16} microorganismos, un número notablemente superior al total de células eucariotas de nuestro cuerpo (Ray, 2001). En personas sanas, la población de microorganismos es enorme y muy diversa, con un peso estimado en un kilogramo. La complejidad de la flora aumenta a lo largo del tracto gastrointestinal, desde el estómago, que contiene sólo una escasa flora de especies ácido-tolerantes, hasta el colon que alberga aproximadamente 10^{12} bacterias por gramo y comprendiendo al menos 500 especies diferentes (Salminen y col., 1998). El crecimiento y la actividad metabólica de la microflora intestinal poseen una influencia notable en el estado fisiológico y nutricional de la persona, jugando un rol muy importante en el mantenimiento de la salud (Salminen y Ouwehand, 2002). La microflora indígena ofrece una barrera de protección frente a microorganismos patógenos basada en la ocupación de nichos disponibles, producción de sustancias inhibitorias, y activación inespecífica del sistema inmune (lo que influencia la composición de la microflora). Además, juega un rol complementario en la nutrición, colaborando en la digestión de ciertos componentes de la dieta y en la síntesis de vitaminas (Havenaar y Huis in't Veld, 1992).

Las medidas dirigidas a lograr el mantenimiento de una flora intestinal saludable, promueven la salud más allá de su acción sobre el intestino. Muchos factores tales como la composición de la dieta, terapias con antibióticos, infecciones, intoxicaciones alimentarias, medioambiente, estrés, estado de salud y edad, pueden influenciar el balance de la microflora. Una microflora intestinal bien balanceada es aquella en la cual las bacterias benéficas (lactobacilos y bifidobacterias) predominan por sobre las bacterias nocivas (Salminen y Ouwehand, 2002).

Bacterioterapia

La primera referencia bibliográfica acerca de los efectos saludables de los probióticos se encuentra en la Biblia, atribuyendo la longevidad de Abraham al consumo de leche agria. En Roma, ya en el 76 A.C., Plinius recomendaba utilizar leche fermentada para el tratamiento de la gastroenteritis.

En sus estudios sobre microorganismos intestinales, Elie Metchnikoff (1845 - 1916) arribó a la hipótesis que, como consecuencia del metabolismo bacteriano de las proteínas, se producen sustancias potencialmente tóxicas que, mediante su absorción desde el intestino y circulación por el torrente sanguíneo, llegan a los tejidos dañándolos y contribuyendo así al proceso de envejecimiento (Tannock, 2002).

En 1907, Metchnikoff fue el primero en sugerir que implantando bacterias lácticas en el intestino, las reacciones patológicas podrían ser eliminadas y de ese modo, se podría “prolongar la vida”. Sus lecturas y publicaciones condujeron a un aumento en el consumo de productos lácteos fermentados en Europa y Norteamérica durante las primeras dos décadas del siglo XX. Estos productos se introdujeron como alimentos relacionados con la salud y el hecho significó el nacimiento de los probióticos (Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Ray, 2001). Por esos mismos años, Henry Tissier, un pediatra francés, estudiando casos de diarrea infantil observó la ausencia de una bacteria irregular en forma de “Y”, que usualmente era dominante en heces de infantes sanos. Tissier sugirió que esas bacterias “bífidas”, hoy conocidas como *Bifidobacterium*, podrían ser usadas para tratar pacientes que padecían diarreas, con el fin de reestablecer una microflora intestinal saludable (Leahy y col., 2005). En Japón, a comienzos de los años '30s, el Dr. Minoru Shirota dirigió sus investigaciones a la búsqueda de cepas de bacterias lácticas benéficas que sobrevivieran al pasaje a través del intestino, y su utilización para el desarrollo de bebidas lácteas fermentadas (Salminen y Ouwehand, 2002).

El interés en la investigación de la bacterioterapia decayó en 1940 y resurgió en los '60s estimulado por resultados alentadores obtenidos en investigaciones realizadas con animales libres de gérmenes. Otro factor estimulante fue el creciente interés de la población

en aspectos relacionados con la salud y los modos naturales de promoverla (Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Ray, 2001).

1.1.2 Evolución del término **probiótico**

La palabra **probiótico** deriva del griego y significa **pro-vida**. El concepto ha ido evolucionando desde comienzos de los años '60 y hasta nuestros días. Fue primeramente empleada por Lilly y Stillwell en 1965 para describir **“sustancias que secretadas por un microorganismo, estimulaban el crecimiento de otro”** (pudiendo ser considerada como un término opuesto al de antibiótico). Esos factores de crecimiento, comenzaron a aplicarse en distintos campos y fue necesario ampliar su significado. En 1971, Sperti empleó el término para referirse a **“extractos de tejido que estimulan el crecimiento microbiano”**, pero estos conceptos no ganaron aceptación en la comunidad científica (Fooks y col., 1999). Parker en 1974, trabajando con suplementos dietarios para animales, fue el primero en emplear el término probiótico en un sentido similar al que se concibe en la actualidad, haciendo referencia a **“organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano del intestino”** (Fioramonti y col., 2003). En 1989, Fuller modifica la definición a **“suplemento dietario microbiano vivo que afecta en forma benéfica al huésped animal mediante el mejoramiento de su balance microbiano intestinal”**. De este modo, destaca la importancia de la viabilidad celular y evita el empleo del término sustancias que resulta demasiado amplio y podría también incluir a los antibióticos (Salminen y Ouwehand, 2002). Sin embargo, esa definición restringe el uso de probióticos a suplementos dietarios, a animales y al tracto intestinal. Havenaar y Huis in't Veld (1992) ampliaron la definición a **“cultivo puro o mixto de microorganismos vivos los cuales benefician al hombre o animales, mejorando las propiedades de la flora indígena”**. Aquí, el concepto de probióticos evoluciona en varios sentidos:

- Se introducen al uso en humanos,
- Su actividad no se restringe sólo al intestino sino que se incluye su posible aplicación en otros sitios (piel, tracto respiratorio, tracto urogenital),

- El probiótico puede consistir en un cultivo puro o una mezcla de cultivos (Salminen y Ouwehand, 2002).

Guarner y Schaafsma (1998) proponen una nueva definición que posteriormente es adoptada en una Consulta de Expertos FAO/OMS (2001). Esta vez no se menciona la necesidad de producir cambios en la microflora intestinal, ni la colonización por el probiótico y se incorpora un nuevo requisito a la definición: la necesidad de proporcionar una dosis adecuada de probióticos para obtener los efectos deseados. Surge así: **“Microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades apropiadas en el alimento, confieren un efecto benéfico al consumidor”** (Servin, 2004, Leahy y col., 2005).

Posteriormente, el concepto de **microorganismo vivo** desaparece. En realidad, existe evidencia de efectos en la salud más allá de los valores nutricionales aportados por productos lácteos fermentados pasteurizados o esterilizados. Por ejemplo, fracciones de yogur y componentes de paredes celulares de lactobacilos y bifidobacterias han ejercido efectos anticarcinogénicos e inmunomoduladores (Schrezenmeir y de Vrese, 2001; Ouwehand y col., 2002). Lee y col. (1999) establecen una definición más amplia: **“Los probióticos son agregados de bacterias vivas o alimentos que contienen cultivos bacterianos vivos o componentes celulares y que tiene efectos benéficos en la salud del huésped”**. En este sentido, es posible considerar como probióticos a preparaciones que no son alimentos, a microorganismos viables o no, y enteros o a sus componentes.

En 2002, Marteau y col. proponen una definición similar aunque más abarcativa en cuanto al tipo de microorganismo, diciendo que se trata de **“preparaciones de células microbianas o componentes de las mismas, que poseen un efecto benéfico sobre la salud y el bienestar del huésped”**. Posteriormente y basados en la consideración de los probióticos como agentes terapéuticos, Charteris y col. se refieren a ellos como **“microorganismos que al ser ingeridos, pueden tener un efecto en la prevención y tratamiento de una condición patológica específica”** (Fioramonti y col., 2003).

Las similitudes entre las definiciones propuestas en los últimos años, reflejan claramente que los investigadores a nivel mundial han llegado a un consenso con relación a este tópico. La definición de probiótico ha evolucionado hacia un concepto simple y directo: **“son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, otorgan un beneficio a la salud del huésped”**. De este modo, se retoma el requisito de que los microorganismos deben encontrarse viables al momento del consumo (Guarner y col., 2005).

1.1.3 Otros términos relacionados

Un concepto que se encuentra fuertemente asociado al de probiótico es el de **prebiótico**. El término fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995, aludiendo a **“ingredientes alimentarios no digeribles que afectan en forma benéfica al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de bacterias en el colon”** (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). Tradicionalmente los prebióticos son empleados para promover el crecimiento de *Bifidobacterium* ssp. y *Lactobacillus* ssp., aunque seguramente, nuevos blancos para el uso de prebióticos serán identificados en el futuro (Rastall y col., 2005). Los **simbióticos** son productos que contienen tanto pro como prebióticos y en donde se produce un sinergismo que puede ser entre ambos componentes (en sentido estricto) o entre el prebiótico y un probiótico de la microflora indígena del tracto gastrointestinal (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). Recientemente ha surgido un nuevo concepto: **los probióticos potenciados**. Se trata de biopreparaciones que contienen cepas de microorganismos y componentes de origen natural. Éstos últimos actúan de un modo sinérgico, potenciando el efecto probiótico tanto en el intestino delgado como en el colon, y su efecto benéfico sobre el huésped, ya sea intensificando un mecanismo o extendiendo el rango de su acción probiótica. El probiótico potenciado debe cumplir con dos requisitos: ser más efectivo que sus componentes por separado y expresar sus efectos estimulantes y potenciados a lo largo de todo el tracto digestivo. Un simbiótico podría considerarse un probiótico potenciado si se adiciona un componente que potencie su efecto probiótico en intestino delgado (Bomba y col., 2002).

Los productos lácteos a los cuáles se les adicionan bacterias probióticas y se encuentran frecuentemente enriquecidos con prebióticos, son el ejemplo más frecuente de alimentos funcionales. *European Functional Food Science Programme* considera a un alimento como funcional si se encuentra satisfactoriamente demostrado que afecta en modo benéfico una o más funciones específicas en el organismo, además de su valor nutricional, de un modo relevante ya sea mejorando el estado de salud y bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad (Saxelin y col., 2003).

I.1.4 Microorganismos empleados como probióticos

Cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son actualmente las más usadas para humanos (Charteris y col., 1998; Chandan, 1999). Por otra parte, el modo de suministro más habitual de los probióticos, como así también de los prebióticos, sigue siendo a través de productos lácteos fermentados (Leahy y col., 2005). Para animales, las cepas más empleadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Nousisinen y Setälä, 1998). Sin embargo, cepas de los géneros *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* se emplean también como probióticos en nutrición humana y animal (Simmering y Blaut, 2001).

Las especies de *Lactobacillus* a partir de las cuales se han aislado cepas probióticas incluyen a *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*; *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. reuteri*. Para *Bifidobacterium*, las cepas pertenecen a las especies *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. lactis*, *B. animalis* y *B. infantis* (Heller, 2001; Tamime, 2002).

I.2 Selección y usos de microorganismos probióticos

I.2.1 Consideraciones generales

Como se mencionó anteriormente, a partir de los años '80 se vivió un gran auge en los modos naturales de promover la salud y en el consumo de leches fermentadas que contenían

bacterias probióticas (IDF, 1992; 1999). Esta demanda estimuló a la industria a desarrollar nuevos productos que se introdujeron al mercado acompañados de anuncios alentadores sobre sus beneficios para la salud, pero sin ninguna evidencia científica. Tales prácticas dieron una connotación negativa a una alternativa que podría haber tenido una base científica seria (Havenaar y Huis in 't Veld; 1992). La evidencia acerca de los cultivos y alimentos probióticos se basó en cuestiones anecdóticas y estudios pobremente controlados (Salminen y col., 1998). La escasa base científica se debe principalmente a dos razones, agravadas por los altos costos de los ensayos clínicos:

- La falta de conocimiento acerca de la complejidad del ambiente intestinal y la dificultad de reconocer especies potencialmente benéficas.
- Una cierta confusión acerca de la identidad, viabilidad y actividad de las cepas (Klaenhammer y Kullen, 1999).

La mayoría de las cepas probióticas empleadas comercialmente no han sido seleccionadas teniendo en cuenta alguna actividad específica. A lo sumo, sólo su identidad ha sido confirmada, correspondiendo a alguna de las especies denominadas “**probióticas**”. Los probióticos que se van a adicionar a productos lácteos deben cumplir con una serie de requisitos, aunque no es razonable esperar que una sola cepa cumpla con todos los efectos benéficos deseables hacia la salud (Gilliland, 1998). Incluso algunas cepas pueden no presentar efectos benéficos (Salminen y Ouwehand, 2002).

Además de los criterios de selección, que se explicitan a continuación, existen una serie de pautas establecidas (Dunne y col., 1999; Lee y col., 1999; Simmering y Blaut, 2001) que deben tenerse en cuenta al momento de seleccionar cepas:

- No son aceptables las extrapolaciones de datos aún entre cepas emparentadas.
- En los ensayos sólo deben usarse cepas, productos y poblaciones bien definidos.
- Todos los estudios en humanos deben ser realizados en poblaciones elegidas al azar y con control de placebos.

- Los resultados deben confirmarse por investigadores independientes.
- Los estudios deben ser publicados preferentemente en revistas con proceso de evaluación.

Otros autores (Ray, 2001; Ouwehand y col, 2003; FAO/OMS 2001), consideran importante además:

- La identificación filogenética de la cepa,
- Los mecanismos mediante los cuales una cepa produce un beneficio,
- La dosis requerida de células viables y el período de tiempo durante el cual el producto debe consumirse para obtener un beneficio,
- El medio de transporte más efectivo y adecuado para que la cepa llegue finalmente al huésped.

Los efectos específicos de cepas probióticas seleccionadas sobre la salud están comenzando a ser aceptados en forma creciente gracias al volumen en expansión de documentación proveniente de estudios clínicos con doble ciego y controlados con placebo (Ouwehand y col., 2002).

Las bases teóricas para la selección de microorganismos probióticos incluyen aspectos de seguridad, funcionalidad y tecnológicos (Salminen y col., 1998). Diferentes factores afectan la elección de un microorganismo para ser empleado como probiótico. Los microorganismos administrados deben ser seguros. Si bien el empleo de bacterias lácticas en alimentos posee una larga tradición y la mayoría de las cepas son consideradas microorganismos comensales sin potencial patógeno (Salminen y Ouwehand, 2002), el uso reciente de aislamientos intestinales puso en tela de juicio su seguridad. Estos nuevos aislamientos no comparten la condición de seguridad alimentaria de las bacterias lácticas tradicionales. Sin embargo, su presencia en productos lácteos en las últimas décadas no ha dado ninguna señal de compromiso de la salud (Sanders y Huis in 't Veld, 1999). Algunos

lactobacilos han sido asociados con septicemia y endocarditis, aunque no se logró evidencia concluyente acerca de su patogenicidad (Curry y Crow, 2002).

Las bacterias ácido-lácticas, especialmente aquéllas empleadas en alimentos fermentados y como probióticos, son consideradas de grado alimentario e internacionalmente se les ha atribuido status GRAS (*generally regarded as safe*) (Ray, 2001). Se recomienda que las bacterias probióticas no contengan genes transmisibles que codifiquen la resistencia a medicamentos utilizados con fines clínicos. Es necesaria una investigación sobre la resistencia de los lactobacilos y las bifidobacterias a los antibióticos y las posibilidades de transmisión de elementos genéticos a otros microorganismos intestinales y/o de origen alimentario (FAO/OMS 2001).

Otra característica importante a fin de garantizar su supervivencia en su pasaje a través del tracto gastrointestinal, es la resistencia a las barreras biológicas (lisozima, bajos pH, bilis, enzimas pancreáticas). La adhesión a la superficie intestinal y subsiguiente colonización del tracto gastrointestinal humano, han sido sugeridas como prerrequisitos para la acción probiótica, ya que la persistencia prolongada de la bacteria ofrece mejores posibilidades de producir efectos metabólicos e inmunomoduladores (Saarela y col., 2000), de lograr la exclusión competitiva de bacterias patógenas y de mejorar la reparación de la mucosa intestinal dañada (Ouwehand y col., 2002). Si bien la mayoría de las cepas en uso son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal, al menos temporalmente, esta habilidad ha sido cuestionada (Salminen y col., 1998). Algunos autores (Ouwehand y col., 2002; Tannock, 2002) consideran que la colonización no necesariamente es un pre-requisito para lograr la llegada de sustancias bioactivas (citoquinas, inmunógenos) al ambiente intestinal, sino que la actividad metabólica de estas bacterias podría resultar más útil. El ecosistema existente en el tracto gastrointestinal en estado fisiológico es notablemente estable, por lo que difícilmente una bacteria ingerida pueda colonizarlo en forma efectiva (Tannock, 2002). Por lo tanto y debido a que los efectos conferidos por los probióticos serían transitorios, parece ser necesaria su ingestión en forma continuada (FAO/OMS 2001).

El hecho de que las cepas para uso en humanos deben ser preferentemente de origen humano, también ha sido recientemente debatido y hasta el momento existe escasa

evidencia científica que soporte esa idea (Farnworth, 2003). En realidad, la mayoría de las cepas empleadas satisfactoriamente tiene este origen y es deseable debido al principio de especificidad de especies. Se conocen algunas propiedades que son especie-específicas, incluyendo la capacidad de adherencia y colonización del tejido intestinal y la capacidad de producir una respuesta inmune (Salminen y col., 1998). Además se piensa que la cepa puede funcionar mejor en un ambiente similar a aquél a partir del cual fue originalmente aislada (Saarela y col., 2000).

1.2.2 Características probióticas

Un factor fundamental para la selección, es que los probióticos ejerzan efectos benéficos para la salud. Entre estos efectos se incluyen:

Control del crecimiento de microorganismos no deseados en el tracto gastrointestinal.

Lb. acidophilus, *Lb. casei* y algunas especies de *Bifidobacterium* demostraron ser capaces de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos indeseables que podrían encontrarse en tracto gastrointestinal (Lee y col., 1999). Los mecanismos mediante los cuales se produce esta actividad antagónica no se han clarificado aún y existen muy pocos estudios realizados *in vivo* (Simmering y Blaut, 2001). Muchos microorganismos producen sustancias que son inhibitorias *in vitro*, tales como ácidos orgánicos (acético y láctico), peróxido de hidrógeno, bacteriocinas. Sin embargo, no se ha comprobado aún que alguna de estas moléculas sean componentes claves en el mantenimiento de la salud *in vivo* (Rastall y col., 2005). Se piensa que la capacidad de agregación, ligado de un microorganismo a otro (Ouwehand y col., 1999), mejora la eliminación (por arrastre) y/o destrucción de patógenos en el tracto gastrointestinal (Charteris y col., 1998). La inactivación de patógenos co-agregados con el probiótico sería más fácil, ya que las sustancias antibacterianas producidas por este último, que actuarían en sus proximidades, lo harían de un modo más efectivo (Vinderola, 2002).

La exclusión competitiva es otro mecanismo sugerido mediante el cual, las bacterias probióticas podrían controlar las infecciones intestinales. Involucra la habilidad de

lactobacilos y bifidobacterias de ocupar sitios de unión en las paredes intestinales, previniendo la adhesión y crecimiento de patógenos (Gilliland, 1998; Simmering y Blaut 2001).

Probablemente, las acciones antagónicas de las bacterias probióticas contra los patógenos intestinales resulten de una combinación de factores.

Actividad β -galactosidasa

Una deficiente digestión de la lactosa es causada por una producción reducida de β -galactosidasa en el intestino. Para los individuos que muestran esta carencia, los productos lácteos fermentados son más fácilmente tolerados en comparación con la leche. Esto se puede explicar por una reducción en la cantidad de lactosa en comparación con la leche (Ray, 2001), y por la presencia de β -galactosidasa en las bacterias que la fermentan (Ouwehand y col., 2002), aunque los cultivos iniciadores del yogur no poseen resistencia a bilis y no se espera que sobrevivan ni crezcan en el intestino. La célula bacteriana protege a la enzima durante el pasaje por el estómago, favoreciendo su llegada en forma activa al intestino delgado (Gilliland, 1998). Luego la bacteria es lisada por la bilis y la enzima liberada hidroliza la lactosa. Además, la mayor viscosidad de las leches fermentadas, en relación con la leche, aumenta el tiempo de permanencia en el intestino, ayudando así a la digestión de la lactosa. En el caso de *Lb. acidophilus* que, a diferencia de los cultivos iniciadores, puede crecer y sobrevivir en el intestino, se cree que ocurre un mecanismo similar: la bilis aumentaría la permeabilidad celular (Gilliland, 1998) sin llegar a la lisis. Por lo tanto, la selección de cepas basadas no sólo en una buena actividad de lactasa, sino también en una escasa resistencia al tránsito estomacal y a las sales biliares, puede ser esencial para asegurar una más eficiente digestión *in vivo* de la lactosa (Charteris y col., 1998).

Adicionalmente, debido a que la enzima es inducible en la mayoría de los microorganismos, es importante que el mismo crezca en un medio con lactosa antes de ser ingerido. Es particularmente importante cuando probióticos que crecen en un medio no lácteo son adicionados a leches no fermentadas (Gilliland, 1998).

Propiedades anticarcinogénicas

Se han obtenido ciertos resultados en el control de cáncer de colon tanto con microorganismos capaces de sobrevivir en el tracto intestinal, como con productos elaborados por cultivos para los que no se espera que posean dicha capacidad. Los mecanismos propuestos son la inhibición directa de la formación del tumor, o indirecta, a través de la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables que, por acción enzimática, pueden generar carcinógenos en el intestino grueso (Gilliland, 1998). Además, las bacterias benéficas, al aumentar la actividad peristáltica intestinal, bajan la concentración de las enzimas y carcinógenos en el colon. Otros estudios han demostrado que la formación de criptas aberrantes, consideradas lesiones potencialmente cancerosas, se reduce por consumo de probióticos, especialmente bifidobacterias (Ray, 2001).

Se sugiere que las bacterias probióticas podrían reducir o prevenir el desarrollo de tumores por activación del sistema inmune, disminución de la producción de pro-carcinógenos o por alteración de la absorción y la excreción de sustancias mutagénicas (Charteris y col., 1998). Si bien la mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que el consumo regular de productos lácteos fermentados está relacionado con disminuciones en los riesgos de ciertos tipos de cáncer (Ouweland y col., 2002), el posible rol de los probióticos en la prevención de cáncer en humanos permanece aún como un tema altamente controversial (Saarela y col., 2000).

Modulación de la respuesta inmune

Los tejidos linfoides asociados al intestino forman parte del sistema inmune e interactúan con antígenos bacterianos o dietarios en el intestino. Esto puede causar una respuesta inmune humoral, mediada por anticuerpos, o celular, mediadas por células T y B (Simmering y Blaut, 2001). La activación del sistema inmune y secretorio por parte de las bacterias lácticas requiere de varias interacciones complejas entre los integrantes de la microflora intestinal (microflora, células epiteliales, células inmunes) (Perdigón y col., 2001). Los efectos inmunomoduladores de microorganismos probióticos fueron demostrados *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación y en humanos. Existen estudios que indican que las

bacterias probióticas estimulan la producción de anticuerpos, aumentan la fagocitosis de patógenos y modifican la producción de citoquinas (Simmering y Blaut, 2001). Algunos autores señalan que la inmunomodulación ha sido observada tanto en sujetos sanos como enfermos (Perdigón y col., 1999; Rastall y col., 2005). Otros autores (Ouwehand y col., 2002; 2003; Salminen y Ouwehand, 2002) en cambio, indican que en el caso de individuos sanos que poseen una respuesta inmune bien balanceada, no se observan modificaciones, aunque encontraron aumentos en los títulos de anticuerpos, cuando se suministran vacunas orales en combinación con el uso de probióticos.

La respuesta inmune causada por una bacteria probiótica es dependiente de la cepa empleada en la estimulación (Gilliland, 1998; Perdigón y col., 1999; Simmering y Blaut, 2001). Los mecanismos que subyacen a las modulaciones observadas no están totalmente esclarecidas, aunque figuran unas pocas explicaciones posibles en la literatura (Simmering y Blaut, 2001) y se sugiere que esta acción involucra a la activación de macrófagos que destruyen a los microorganismos patógenos (Gilliland, 1998) e implican la traslocación de una parte de las células ingeridas en el intestino delgado (Charteris y col., 1998). Esta estimulación del sistema inmune incrementa las defensas del huésped y podría explicar cómo ciertos microorganismos probióticos pueden ejercer control sobre infecciones intestinales (Gilliland, 1998). De modo opuesto, la reducción en la respuesta inmune se observó en enfermedades alérgicas, donde los probióticos mostraron su rol regulatorio tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Ouwehand y col., 2002).

Finalmente, se sabe que los probióticos son efectivos sólo si el dosaje es lo suficientemente elevado (Simmering y Blaut, 2001), aunque en realidad, se han realizado pocos estudios del tipo dosis – respuesta (Salminen y Ouwehand, 2002).

Medici y col. (2004), en un estudio reciente realizado con ratones alimentados con un queso fresco adicionado con tres bacterias probióticas, determinaron:

- una **dosis** oral óptima de queso, tal que no se afectara la integridad del epitelio intestinal ni el balance de la microflora residente, y para la cual se observó una influencia positiva sobre el sistema inmune debido al consumo.

- No sólo el **efecto causado** por el consumo de las bacterias probióticas suministradas como **cultivo puro**, sino también del **producto** conteniendo a las cepas probióticas.
- La **duración y el patrón temporal de consumo** adecuados, para optimizar los efectos ejercidos sobre el sistema inmune.

En este trabajo se observa además otro ejemplo de modulación del sistema inmune, ya que en primer lugar se observó una estimulación del mismo, tanto en los macrófagos como en el aumento de células productoras de IgA en intestino y luego, la homeostasis del sistema inmune. Éste se autorregula evitando una respuesta inflamatoria debido a una sobreestimulación de la mucosa intestinal.

Según Tannock (2002), pueden plantearse numerosos interrogantes en las relaciones entre las bacterias probióticas y el sistema inmune del consumidor:

- si la respuesta inmune dirigida es similar a la que provocan los patógenos o los microorganismos de la flora indígena
- si la misma bacteria probiótica, ingerida día a día, podrá inducir un estado de tolerancia oral
- si el efecto inmunomodulador de un producto probiótico puede perderse con el consumo regular prolongado.

El impacto del consumo de un probiótico sobre el sistema inmune humano necesita ser estudiado en el tiempo, con el objetivo de comprender las relaciones entre la microflora intestinal y el sistema inmune (Tannock, 2002).

Reducción del nivel de colesterol sérico

Algunas cepas de *Lb. acidophilus* pueden asimilar o incorporar colesterol durante su crecimiento *in vitro* en anaerobiosis y en presencia de bilis, condiciones similares a las

encontradas en intestino. Otro mecanismo está relacionado con la capacidad de deconjuguar sales biliares de ciertas cepas probióticas. Los ácidos biliares libres son menos absorbidos que los conjugados y son eliminados, en mayor medida, en las heces. El colesterol es un precursor de la síntesis de ácidos biliares en hígado, por lo que el organismo empleará colesterol sérico para reemplazar a los ácidos biliares excretados. Adicionalmente, los ácidos biliares libres son menos eficientes que los conjugados para lograr la absorción del colesterol presente en tracto intestinal (Gilliland, 1998; Ray, 2001).

Producción de vitaminas y exopolisacáridos

Muchas bacterias lácticas alteran el contenido de vitamina B de la leche al desarrollar en ella. Algunas vitaminas del complejo B son consumidas y otras producidas. En general, una leche fermentada tiene un mejor contenido de vitaminas que la leche de partida (Vinderola, 2002).

La presencia de exopolisacáridos en lácteos fermentados, además de mejorar las propiedades reológicas y sensoriales del producto (Roberts y col., 1995; Tamime, 2002), se ha relacionado con una mejor adhesión al epitelio, y una mejora en la resistencia a la inmunidad específica y no específica del huésped (Charteris y col., 1998). Algunos exopolisacáridos contienen gluco y/o fructo-oligosacáridos y pueden generar ácidos grasos de cadena corta por hidrólisis en el tracto intestinal, mediada por la microflora del colon. Como consecuencia, pueden presentar beneficios potenciales a la salud (efectos antitumorales, de disminución del colesterol o inmunomoduladores) y a la nutrición, como un prebiótico (Torino y col., 2000; Tamime, 2002).

1.2.3 Aspectos tecnológicos

A fin de garantizar su viabilidad en alto número en el producto final, los microorganismos potencialmente probióticos deben poseer buenas propiedades tecnológicas. Deben ser cultivables a gran escala, es decir, ser capaces de crecer hasta altas densidades celulares en un medio no costoso (Vinderola, 2002). Dado que muchas cepas de probióticos no crecen bien en leche, la misma debe ser suplementada con glucosa, extracto

de levadura o distintas fracciones proteicas de la leche (Salminen y Ouwehand, 2002). Estas dificultades relacionadas con la propagación en el sitio de producción, hace que la mayoría de las preparaciones comerciales de cultivos probióticos se manejen industrialmente como cultivos concentrados congelados o liofilizados para ser usados en aplicaciones directas a la tina (Saarela y col., 2000). Otro método utilizado para permitir el desarrollo de los probióticos en leche es el co-cultivo con cepas “soporte” (usualmente *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactobacillus bulgaricus*) que además permite acortar los tiempos de la fermentación (Curry y Crow, 2002; Saxelin y col., 2003). Las interacciones posibles entre las cepas que integran la formulación microbiológica global del producto deben considerarse para elegir la mejor combinación a fin de optimizar su acción tecnológica en el proceso y su supervivencia en el producto. (Kailasapathy y Rybka, 1997; Heller, 2001; Vinderola y col., 2002b). Además, cuando las bacterias lácticas iniciadoras se usan conjuntamente con las probióticas, el valor probiótico total de los alimentos podría incorporar una contribución eventual de las bacterias lácticas del fermento (Vinderola y Reinheimer, 2003; Guglielmotti y col., 2006b). En estos productos probióticos fermentados, es importante además, que el cultivo probiótico realice un aporte positivo, o no afecte, a las propiedades sensoriales incorporándose al alimento sin producir aromas, sabores o texturas desagradables (Salminen y col., 1998; Saarela y col., 2000; Ouwehand y col., 2002).

Otras propiedades tecnológicas importantes son la supervivencia a lo largo de todo el proceso de manufactura y la estabilidad durante el almacenamiento, tanto del cultivo concentrado congelado o liofilizado, así como también en el producto alimenticio en el cual son finalmente formulados. Debe asegurarse que no existan interacciones adversas entre los probióticos y la matriz del alimento (Heller, 2001), implicando por ejemplo, resistencia a bajos pH, a bacteriofagos y a aditivos comúnmente usados (Charteris y col, 1998; Vinderola y col., 2002a), tolerancia al oxígeno, especialmente en el caso de bifidobacterias (Hughes y Hoover, 1995), entre otros.

La viabilidad y actividad adecuadas de los probióticos son consideradas pre-requisitos para la óptima funcionalidad. Sin embargo, algunas cepas pueden también causar efectos benéficos para el huésped, aún sin llegar viables. En esos casos particulares, sería

suficiente garantizar una propagación eficiente de modo de contar con concentraciones elevadas en el producto, aunque luego no retengan su viabilidad durante el almacenamiento (Saarela y col., 2000).

La resistencia del cultivo probiótico frente a los bacteriofagos es un aspecto tecnológico de gran implicancia para las industrias y será abordado con detalle en la Sección II.

I.2.4 Perspectivas futuras

Al presente, se plantean varias alternativas:

Probióticos no viables:

Aunque en la mayoría de las definiciones se enfatiza la importancia de la viabilidad de los microorganismos, algunos estudios indican que los probióticos no viables pueden tener también efectos sobre la salud, por ejemplo en casos de mala digestión de la lactosa. Los probióticos no viables podrían presentar ventajas tales como una vida útil más prolongada, una seguridad mejorada y almacenamiento y transporte sin exigencia de refrigeración (Ouwehand y col., 2002).

Probióticos en alimentos no-lácteos:

Como se indicó anteriormente el uso más frecuente de los probióticos es en productos lácteos. Su aplicación en otro tipo de alimentos representa un desafío y exige el estudio de la viabilidad del probiótico en la matriz del alimento. En casos en que existan factores desestabilizantes (por ej., en alimentos que se almacenan a temperatura ambiente), la tecnología de encapsulamiento de microorganismos presenta una opción para asegurar la viabilidad y estabilidad del probiótico (Saarela y col., 2000).

Alimentos con múltiples cepas probióticas:

Alimentos funcionales dirigidos a mantener o mejorar el bienestar de los consumidores, que contienen más de una cepa probiótica, de modo de lograr más de un

efecto benéfico en un único producto. Se diseñan de un modo racional, considerando que los mecanismos de acción de los probióticos pueden ser diferentes (Saxelin y col., 2005).

Alimentos con probióticos dirigidos a consumidores específicos:

Los conocimientos adquiridos en relación con la microbiota intestinal, nutrición, inmunidad, mecanismos de acción y enfermedades específicas, cuidadosamente combinados con información genética, permitirán el desarrollo de una segunda generación de probióticos: cepas que actúen en un sitio determinado y para individuos que padecen enfermedades específicas o tienen necesidades particulares (Gueimonde y Salminen, 2002). Probablemente estos productos requerirán de condiciones de producción más controladas, similares a las establecidas para alimentos medicinales (Saxelin y col., 2005).

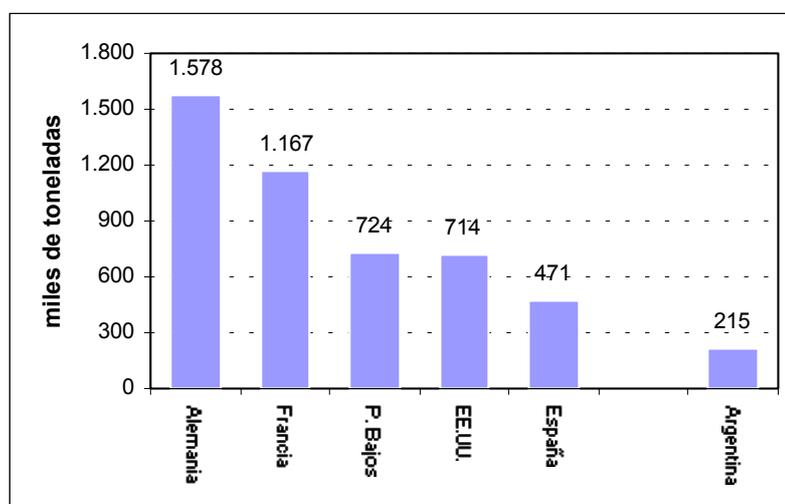
Alimentos con cepas probióticas modificadas:

Las modificaciones pueden lograrse mediante inducción tradicional o genéticamente. Resultados preliminares obtenidos recientemente indicaron que, debido a la inactivación de un gen, una cepa de *Lb. plantarum* produjo un ácido lipoteicoico modificado que mejoró notablemente la capacidad anti-inflamatoria en ratones (Saxelin y col., 2005).

1.2.5 Empleo de probióticos en el mundo

En el transcurso de los últimos 50 años, cepas probióticas de lactobacilos y bifidobacterias han sido incorporadas en diferentes productos lácteos en el mundo occidental. Sin embargo y con escasas excepciones, recién a partir de los '90 la investigación sobre probióticos se intensificó notablemente y la evidencia clínica permitió aseverar los efectos benéficos sobre la salud debido al consumo diario de probióticos (Playne y col., 2003; Saxelin y col., 2005). Este hecho, junto con la tendencia en el mercado mundial hacia productos naturales, frescos y sanos, produjo en muchos países un incremento en el consumo de leches fermentadas (Tamime, 2002). En los principales países productores de yogur y leches cultivadas, la elaboración creció fuertemente entre 1990 y 1997 (Fig. 1). Importantes

aumentos fueron registrados en España (75%) y Estados Unidos (53%), en ambos casos debido al creciente consumo interno (Schaller y col., 2003).



Fuente: ZMP Review - Dairy 1998

Figura 1. Producción mundial de yogur y leche cultivada durante el año 1997.

El mercado global de alimentos funcionales es grande y se encuentra en rápido crecimiento, principalmente en Norteamérica, Europa y Asia. Su valor se estimó en aproximadamente US\$ 50 mil millones (EEUU US\$ 18,25 mil millones; Europa US\$ 15,4 mil millones; Japón US\$ 11,8 mil millones) en 2002 con un crecimiento esperado de 7% a lo largo de 2005. Dentro de los alimentos funcionales, un segmento significativo y también en fuerte crecimiento, está representado por el mercado global de productos lácteos e ingredientes funcionales, que de US\$ 4,1 mil millones en 1998 (excluyendo a Japón) se proyectó que llegaría a unos US\$ 5,3 mil millones en 2003. Los productos pre y probióticos representaron aproximadamente un 60% del mercado de alimentos funcionales en Europa y Australia en 1999 y una proporción menor en EEUU. En Japón, la mayoría de las leches y yogures contienen ingredientes funcionales. Las ventas totales de leches, yogures y leches fermentadas en Japón, representaron unos US\$ 2,2 mil millones en 1998 (Playne y col., 2003).

Los productos lácteos fermentados enriquecidos con probióticos se han convertido en una de las categorías más exitosas dentro de los alimentos funcionales. Actualmente existe

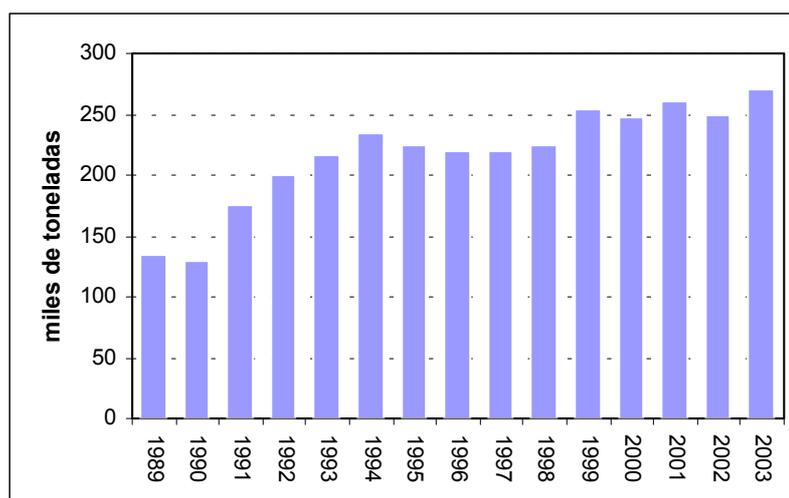
en el mundo una gran variedad de productos lácteos que contienen cepas pertenecientes a las principales especies reconocidas como probióticos (Lee y col., 1999; Tamime, 2002). Recientemente, surgió una categoría completamente nueva: “*daily-dose drinks in small bottles*”, con un volumen de mercado de más de un millón de toneladas que representan más de 1200 millones de Euros anuales de las ventas minoristas en Europa (Saxelin y col., 2005) (Tabla 1). Tanto Yakult (con *Lb. casei* Shirota), como Actimel (con *Lb. casei* defensius (Imunitass) DN 114001), son ejemplos de esta categoría de productos.

Tabla 1. Especies empleadas habitualmente como probióticos, denominación de sus cepas y productos comerciales.

Especies	Cepas	Nombres comerciales
<i>Lactobacillus casei</i>	DN 114001	Actimel®
<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota	Yakult ®
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v	ProViva®
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG	Actifit Plus ®, Gefilus®, LGG®, Onaka He GGI®, Vifit®, etc.
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	La1	LC1®
<i>Bifidobacterium lactis</i>	BB12	varios nombres comerciales

I.2.6 Empleo de probióticos en Argentina

Nuestro país no quedó al margen de la tendencia mundial y su producción de yogur y leche cultivada mostró un vertiginoso crecimiento a partir de los años '90 (Fig. 2), acompañando el fuerte crecimiento del consumo interno, destino casi excluyente de estos productos. Importantes inversiones en plantas elaboradoras, concretadas en la segunda mitad de la década, junto con permanentes avances en investigación y desarrollo, constante lanzamiento de nuevos productos altamente diferenciados y para segmentos específicos de consumidores, y fuertes campañas de promoción y publicidad, hacen que el perfil de este mercado sea altamente competitivo y dinámico (Schaller y col., 2003).

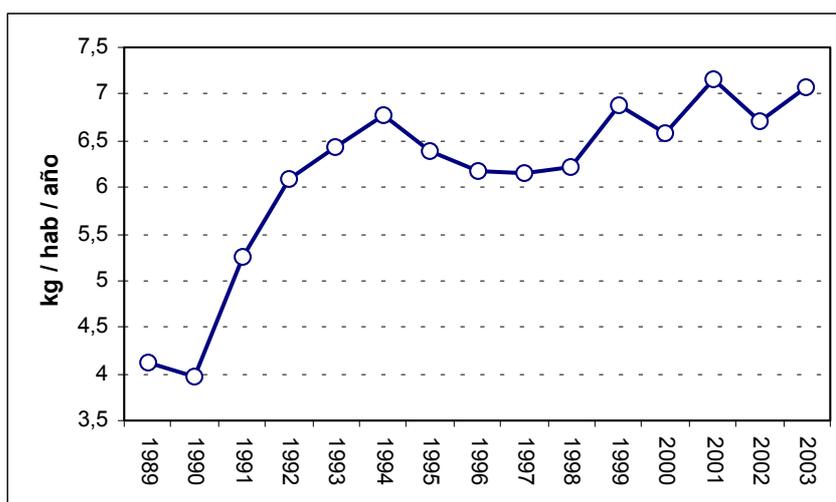


.Fuente: Convenio S.A.G.P. y A. - CIL - FIEL.

Figura 2. Producción argentina de yogur y leche cultivada en el período 1989 - 2003.

En el período 1990-1994, la tasa anual de crecimiento de la producción nacional de yogur y leche cultivada fue de un significativo 16%. En la década 1994-2003, con algunos altibajos que acompañaron los vaivenes del consumo interno, la producción presentó una expansión del 1,8% anual. En 2003, la producción nacional registró su record histórico con algo más de 271.000 toneladas, lo que significó un alza del 10% respecto del año anterior. En este caso, el 3% de la leche destinada a la elaboración de productos se asignó a yogur. En 2004, el 3,4% de la leche se destinó a yogur, elaborándose 357.140 tn (aprox. 291.500 miles de litros) y en el primer semestre de 2005, la producción fue de 155.542 miles de litros (www.cil.org.ar).

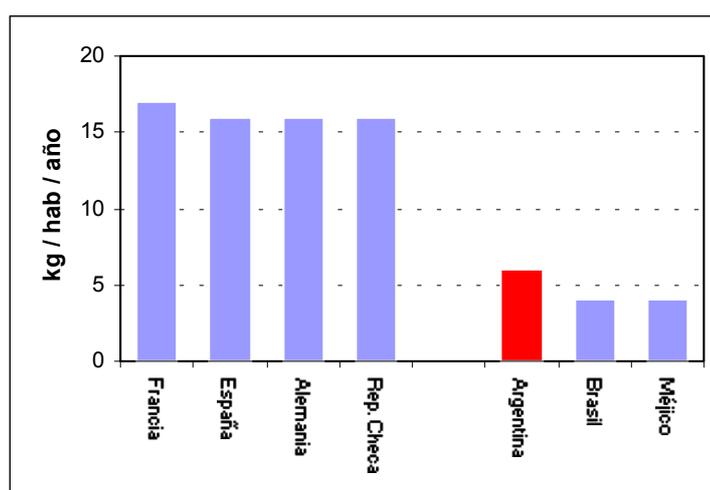
La explosión del consumo interno se registró entre 1990 y 1994, lo que posibilitó que la ingesta promedio del país pasara de 4 a 7 kg/hab.año (Fig. 3). Entre 1994 y 2003, se delimitan dos etapas bien distintas: una primera mitad, en la que el consumo mostró una tendencia declinante y un quinquenio final en el que, a pesar de los altibajos, se observa una recuperación hasta niveles récord (Schaller y col., 2003).



. Fuente: Convenio S.A.G.P.y A. - CIL - FIEL.

Figura 3. Consumo anual de yogur y leche cultivada por habitante en nuestro país en el período 1989 - 2003.

El consumo per capita argentino supera en un 50% al de los dos más grandes países latinoamericanos -Brasil y México-, aunque representa apenas un tercio del promedio del grupo de las principales naciones consumidoras a nivel mundial, lo que marca el gran potencial de crecimiento de nuestro mercado doméstico (Fig. 4). El crecimiento de la ingesta por persona de yogur y leche fermentada para 2004 se estimó en aproximadamente un 40%, respecto de 2003 (Schaller y col., 2003).



.Fuente: ACNielsen

Figura 4. Consumo anual de yogur por habitante en distintos países del mundo en el año 2003.

El mercado de yogur es uno de los más dinámicos del sector lácteo. La estrategia es la diferenciación constante y el lanzamiento de nuevos productos. La incorporación de organismos probióticos, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, merece un párrafo aparte. En línea con la tendencia mundial, la elaboración de "alimentos funcionales", enriquecidos con bacterias específicas, es hoy muy común en nuestro país. Como ejemplos pueden mencionarse: *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* como integrantes de la microflora de la LECHE BIO (desarrollada en CERELA – Centro de Referencia para Lactobacilos, Tucumán – y comercializada por SanCor) (Vinderola, 2002); la introducción de "Probio2" y "Biopuritas" por parte de Danone-La Serenísima para sus líneas "Yogurísimo" (enteros) y "Ser" (descremados), respectivamente (Vinderola, 2002); la leche fermentada ACTIMEL (base de yogur y *Lb. casei defensis*) y el producto simbiótico ACTIVIA (base de yogur, bifidobacterias y fructooligosacáridos). Recientemente, Conicet y SanCor sacaron a la venta otro producto simbiótico, desarrollado en forma conjunta. El nuevo SanCor Bio contiene cepas probióticas de *Lb. casei* (SanCor CRL 431), *Lb. acidophilus* (SanCor CRL 730) y fructanos naturales que actúan como prebióticos estimulando el crecimiento de bifidobacterias (<http://www.conicet.gov.ar/NOTICIAS/2006/marzo/004.php>). En la línea de quesos adicionados con cultivos probióticos, Argentina fue el primer país de Latinoamérica en reportar la adición simultánea de *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* y *B. bifidum* a un queso fresco (Vinderola, 2002; Vinderola y col., 2003).

Si bien habitualmente la bibliografía y la estadística internacional y nacional, no discriminan entre yogur y leche cultivada, por todo lo expuesto puede concluirse que el mercado de las leches fermentadas adicionadas de probióticos está experimentando una expansión constante en Argentina.

1.3 *Lactobacillus casei* como microorganismo probiótico

1.3.1 Características generales

El género *Lactobacillus* comprende a bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos, que comúnmente producen ácido láctico como principal

metabolito de la fermentación de hidratos de carbono. Generalmente son aislados a partir de leches fermentadas y del tracto gastrointestinal de humanos y animales (Curry y Crow, 2002). Las principales especies de lactobacilos aislados de tracto intestinal humano incluyen *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. casei*, *Lb. ruminis*, *Lb. itulinus*, *Lb. plantarum* y *Lb. brevis*. *Lb. acidophilus* rara vez se aísla de ese origen (Matsuzaki, 2003).

El género se divide en tres grupos diferentes sobre la base de las vías de fermentación de hidratos de carbono:

Homofermentantes obligados: fermentan las hexosas casi completamente hasta ácido láctico. No fermentan pentosas o gluconato.

Heterofermentantes facultativos: fermentan las hexosas casi completamente a ácido láctico. En condiciones de glucosa limitante, fermentan las hexosas produciendo ácido láctico, acético, fórmico y etanol. Las pentosas son fermentadas hasta ácido láctico y acético.

Heterofermentantes obligados: fermentan las hexosas hasta ácido láctico, CO₂, ácido acético y etanol. Las pentosas son fermentadas hasta ácido láctico y acético.

Los miembros del grupo *casei* son bacilos cuyas dimensiones son 0,7 – 1,1 µm x 2,0 – 4,0 µm y se presentan aislados, de a pares o en cadenas. El % de C+G de ADN es aproximadamente 45 – 47 mol %. En su pared celular, el peptidoglicano es del tipo Lys-D-Asp y no se encontraron ácidos teicoicos unidos a ella. Son esenciales para su crecimiento la riboflavina, ácido fólico, calcio, pantotenato y niacina. Todas las especies del grupo son heterofermentantes facultativos.

Los lactobacilos del grupo *casei* exhiben una heterogeneidad fenotípica y genotípica considerable y se hicieron varios intentos para clasificarlos. En el pasado, todos los miembros fueron clasificados como *Lb. casei* con 5 subespecies (*alactosus*, *casei*, *pseudoplantarum*, *rhamnosus* y *tolerans*). La clasificación se basó en propiedades fenotípicas, particularmente la fermentación de hidratos de carbono. Estudios más recientes que emplearon homologías

ADN – ADN y secuenciación de ARNs 16S, mostraron la existencia de tres agrupamientos distintos, si bien el nombre asignado a cada grupo ha creado cierta controversia. Es generalmente aceptado que *Lb. casei* subsp. *ramnosus* es un grupo separado y se lo designó *Lb. ramnosus*. Sin embargo existen diferentes opiniones (Dellaglio y col., 2002; Reuter y col., 2002; Dobson y col., 2004) acerca de cuál de los otros dos grupos debe llamarse *Lb. casei* y cómo debería designarse al tercer grupo.

La taxonomía vigente considera al grupo *casei* conformado por tres especies:

- *Lb. casei* (cepa tipo ATCC 393)
- *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (cepa tipo ATCC 334) y *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* (cepa tipo ATCC 25599)
- *Lb. ramnosus* (cepa tipo ATCC 7469)

(Curry y Crow, 2002).

Otros autores (Dellaglio y col., 2002; Dobson y col., 2004) opinan que la especie *Lb. casei* no está adecuadamente representada por ATCC 393 y proponen que esta cepa sea reclasificada como *Lb. zae* y que se unifiquen bajo el nombre de *Lb. casei* a las cepas consideradas *Lb. paracasei*, con la cepa ATCC 334 como cepa tipo. Proponen además, la eliminación del nombre *Lb. paracasei*.

En este contexto, debe considerarse la posibilidad de que al referirse a cepas de *Lb. casei* en la bibliografía más antigua, en realidad se trate de *Lb. paracasei*, según la taxonomía actual.

1.3.2 Lactobacilos del grupo *casei* en quesos

Las fuentes de bacterias lácticas no adicionadas con el fermento (NSLAB, por su sigla en inglés) en quesos han sido objeto de mucho debate ya que se han encontrado en quesos elaborados tanto a partir de leche cruda como pasteurizada. En el caso de quesos

tradicionales europeos elaborados a partir de leche cruda, probablemente es esa la fuente principal de ingreso de las NSLAB. Sin embargo, en quesos que se elaboran con leche pasteurizada, como el Cheddar, las NSLAB también se encuentran presentes. En estos casos, contaminaciones post – pasteurización o una inactivación incompleta de las NSLAB presentes en la materia prima, podrían ser las responsables (Beresford y col., 2001). Los lactobacilos mesófilos son probablemente los miembros más comúnmente encontrados entre las NSLAB. Muchos de ellos han sido aislados de quesos, pero los que se encuentran más frecuentemente pertenecen al grupo *casei* (particularmente *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y *Lb. rhamnosus*), *Lb. plantarum*, y *Lb. curvatus* (Beresford, 2003). Si bien las NSLAB generalmente no crecen bien en leche y no contribuyen a la producción de ácido en la tina (Beresford y col., 2001), en quesos madurados por más de seis meses pueden influenciar el flavor en forma positiva o negativa. Se han identificado algunas cepas de *Lb. rhamnosus* y *Lb. paracasei* capaces de producir atributos interesantes y progresivamente comenzaron a adicionarse a las tinas como fermentos adjuntos, con los propósitos de proveer una maduración controlada, acelerada, o producir atributos específicos (Curry y Crow, 2002).

Algunas NSLAB, en particular ciertos lactobacilos mesófilos y enterococos, se ha demostrado que pueden funcionar como probióticos y que el queso es un vehículo muy adecuado para hacerlos llegar viables al tracto gastrointestinal (Beresford, 2003).

1.3.3 Lactobacilos del grupo *casei* en leches fermentadas

Lb. rhamnosus y *Lb. paracasei* pueden adicionarse a leches fermentadas por sus beneficios a la salud, pero no acidifican rápidamente la leche. También pueden agregarse para que aporten exopolisacáridos, bacteriocinas o compuestos de aroma (Curry y Crow, 2002). Si bien algunas cepas son lo suficientemente proteolíticas como para crecer bien en leche, la mayoría de los cultivos comerciales se disponen en forma de fermentos de alta concentración (congelados: 10^{10} ufc/ml o liofilizados: 10^{11} ufc/ml) para aplicación directa, debido a las dificultades involucradas en su propagación. Cuando se seleccionan microorganismos iniciadores, la característica más deseable es que posean una buena

capacidad acidificante; en cambio, en la selección de probióticos el criterio está relacionado con impactos sobre la salud. Ya que el ambiente del tracto gastrointestinal y el del alimento pueden ser muy diferentes, el probiótico muy frecuentemente no es adecuado como microorganismo iniciador (Saarela y col., 2000).

Una forma de resolver el inconveniente de mostrar una velocidad de crecimiento muy lenta, es implementar procesos asépticos como en el caso de la leche fermentada acidófila (Saarela y col., 2000) y de la leche fermentada Actimel[®]. Otra alternativa es hacer el alimento más adecuado como sustrato para el probiótico agregando estimulantes del crecimiento. Sin embargo, con frecuencia no es suficiente y además a veces la textura y/o el sabor del producto lácteo fermentado no son aprobados por los consumidores o es tecnológicamente impracticable. Por estas razones, es común el empleo de cepas probióticas y, conjuntamente, cultivos iniciadores tradicionales (del yogur o cultivos mesófilos) que son los responsables de la rápida producción de ácido.

Los probióticos pueden adicionarse en distintos momentos del proceso de elaboración:

- Previo a la fermentación de la leche, junto con los cultivos iniciadores tradicionales;
- En forma paralela, fermentando distintas porciones de leche con el probiótico y con los cultivos iniciadores y luego mezclarlas;
- Posterior a la fermentación con los cultivos lácteos iniciadores, sin propagación del cultivo probiótico.

Existen incluso productos en donde no se produce una fermentación de la leche (Saxelin y col., 2003).

El hecho de que los cultivos probióticos sean capaces de desarrollar durante la fermentación aumenta la concentración final del mismo en el producto, resultando en un menor costo de proceso y una mejor adaptación del probiótico al alimento fermentado. En contrapartida, el empleo de probióticos como cultivos iniciadores de crecimiento lento, hace que sean particularmente vulnerables al ataque de bacteriofagos, que necesitan de células en propagación para poder multiplicarse.

1.3.4 *Lactobacillus casei* / *paracasei* como microorganismo probiótico

Lb. casei es la especie más estudiada entre las bacterias lácticas por sus efectos sobre la reducción de incidencia y duración de varios tipos de diarrea y su capacidad de modular el sistema inmune específico e inespecífico. Es útil en la prevención y tratamiento de diarreas relacionadas a antibióticos, diarreas de viajero y diarrea infantil. Esa propiedad parecería relacionarse con la capacidad de modificar la actividad de la microflora intestinal, previniendo el desarrollo de microorganismos potencialmente indeseables (Kalantzopoulos, 1997).

Estudios realizados en ratones, relacionados con la eficacia protectora y terapéutica de *Lb. casei* frente a infecciones microbianas inducidas, establecieron que *Lb. casei* posee una gran capacidad de aumentar la resistencia del huésped frente a varios tipos de infecciones microbianas, en particular causadas por patógenos oportunistas. La acción protectora y terapéutica se basa principalmente en la capacidad de activación de macrófagos, causando un considerable incremento en el reclutamiento de monocitos provenientes de la circulación hacia el sitio de la infección, y un aumento en las funciones antimicrobianas. Se piensa que ciertas sustancias producidas por la fermentación de la leche con lactobacilos, o algún componente de su pared celular producido por digestión de estos microorganismos, jugarían un rol importante en el aumento del sistema inmune del huésped. Se observó que ciertos componentes de la pared celular pueden exhibir una acción directa sobre los macrófagos, causando un aumento en la producción de ciertas citoquinas producidas por éstos, las cuales median la activación de los macrófagos, potenciando su actividad microbiana (Tomioka y Saito, 1992).

Algunos autores (Reid, 1999; Ray, 2001), basándose en una evaluación crítica de la evidencia científica, consideraron efectivas sólo a dos cepas de *Lb. casei* para su uso como probiótico: *Lb. casei* Shirota (LcS) y *Lb. casei* CRL 431.

LcS fue aislada a partir de intestino humano y fue cultivada por primera vez en 1930 por Minoru Shirota en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la

Universidad de Kyoto, Japón. LcS es resistente a los ácidos gástricos y biliares, de modo que la bacteria viva alcanza el intestino delgado luego de la administración oral. El Dr. Shirota desarrolló el “Yakult”, una bebida láctea fermentada con LcS y fue por primera vez producido en 1935 por la compañía Honsha Co ltd.

El Yakult está basado en la hipótesis que el consumo diario de bacterias lácticas promueve la salud intestinal y previene enfermedades, prolongando la vida. Ha sido vendido en todo el mundo por más de 60 años. La elaboración es de aproximadamente 700 millones y 1500 millones de unidades por día, en Japón y en otros países, respectivamente (Matsuzaki, 2003).

El Yakult se obtiene por fermentación con LcS de un medio de pH 6,5, que tiene principalmente leche descremada 15% (con un tratamiento térmico intenso) adicionado de extracto de *Chlorella* (0,4%). La acidez titulable del cultivo llega a un máximo en 3 ó 4 días a 37°C con un pH de aproximadamente 3,6 (Watanabe y col., 1970).

LcS posee un rango de actividad biológica que impacta favorablemente en la salud humana (Spanhaak y col., 1998) y ha sido intensamente estudiado en el Instituto Yakult (Yakult Central Institute for Microbiological Research, Tokio, Japan) y en otros laboratorios (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos positivos de *Lactobacillus casei* Shirota en modelos animales y en humanos (adaptado de Farnworth (2003)).

Enfermedad / condición	Efecto de LcS
ANIMAL	
Movimiento intestinal	Normaliza
Tumores	Inhibe
Modulación del sistema inmune	Regula (aumento)
Metastasis	Inhibe
Infección	Inhibe
Inmunoglobulina E	Inhibe a la IgE y aumenta las citoquinas
Hipertensión	Inhibe el incremento de presión sanguínea
Diabetes	Previene
Autoinmune	Previene
Artritis	Previene
HUMANO	
Normalización de flora intestinal	Normaliza
Constipación	Decrece la constipación
Cáncer de útero / pulmón	Prolonga la sobrevida
Cáncer vejiga	Previene la recurrencia
Modulación del sistema inmune	Aumenta la actividad NK

Con respecto a la cepa *Lb. casei* CRL 431, de Chr. Hansen, a partir de estudios *in vitro* y con animales, se obtuvo evidencia de adhesión y de exclusión competitiva de los patógenos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium*. Su lugar de aplicación es intestinal y su modo de acción parece ser la habilidad de incrementar la actividad fagocítica y de secreción de IgA. Esta habilidad de incrementar las funciones inmunes del huésped puede tener usos clínicos muy amplios. Si bien existe evidencia creciente de que esta cepa puede ser un agente probiótico efectivo para estimular la respuesta inmune, prevenir infecciones por bacterias enteropatógenas y en la prevención y tratamiento de diarrea, deben realizarse más estudios en humanos, examinando los mecanismos de acción (Reid, 1999).

Otras cepas se mostraron promisorias en algunos estudios sobre humanos o *in vitro*, aunque se han considerado con escasa base científica, como en el caso de *Lb. casei* DN 114001 (Danone, Paris, Francia) (Reid, 1999). Sin embargo, en los últimos años han surgido numerosos estudios sobre el efecto de esta cepa sobre el sistema inmune.

El producto Actimel® se obtiene por fermentación de leche con cultivos empleados para obtener yogur (*St. thermophilus* y *Lb. bulgaricus*) y *Lb. casei* DN 114001. Se ha demostrado que la cepa es resistente a ácidos gástricos y biliares, sobreviviendo al pasaje a través del tracto digestivo (5 a 10% de la cantidad ingerida o más de 5.10^7 ufc/g de yogur). Durante la digestión, Actimel conserva una cantidad del cultivo suficiente para garantizar una acción efectiva *in vivo* (<http://ireland.actimel.com/scientific/index2.html>). Si se suministra a la dieta de infantes por un tiempo adecuado, es capaz de colonizar el intestino en forma permanente, aumentando las funciones digestivas enzimáticas, siendo además efectiva en disminuir la incidencia y duración de la diarrea en este grupo etario (Pedone y col., 1999; 2000; Rastall y col., 2005). Esta cepa ejerce un efecto antimicrobiano, gracias a su capacidad de modular el sistema inmune entérico, por estimulación de la hipersensibilidad retardada, mediante la formación de anticuerpos y la inducción de células NK, aún en estados de estrés físico (Salvini, 2003). En un estudio realizado con ratones alimentados con una leche fermentada que contiene a esta cepa probiótica, y desafiados con una *E. coli* enteroinvasiva, se observó un aumento en la respuesta inmune inespecífica (en los porcentajes de fagocitosis y de células productoras de IgA presentes en intestino delgado). Además, los animales tratados presentaron una colonización (en hígado) por el patógeno menor y una mayor concentración de IgA anti *E. coli* en fluidos intestinales, con relación a animales control. Estos resultados se asociaron con un aumento en la inmunidad mucosa de intestino (Medici y col., 2005). Otros estudios mostraron modulación de la respuesta inmune en estudiantes bajo estrés por exámenes (Marcos y col., 2004), reducción en la duración de infecciones invernales (respiratorias y gastrointestinales) en ancianos (Turchet y col., 2003), beneficios adicionales en el tratamiento de erradicación de *Helicobacter pylori* en niños al suplementar la terapia triple con Actimel (Sykora y col., 2005).

II BACTERIOFAGOS

II.1 Generalidades

Los bacteriofagos son los virus que infectan bacterias. En 1957, Andre Lwoff los definió como agentes infecciosos compuestos por proteínas y ácidos nucleicos, incapaces de crecer en forma autónoma o reproducirse por fisión binaria (Helvoort, 1996). En cambio, se reproducen parasíticamente, necesitan de células viables en multiplicación y la progenie de nuevas partículas fágicas se libera al medio luego de producirse la lisis celular. Esto se logra porque los fagos provocan un cambio en el metabolismo celular, tal que la producción de componentes celulares se reemplaza por la síntesis de nuevas partículas fágicas (Neve y Teuber, 1991). Fue en 1935 que Whitehead y Cox reconocieron por primera vez una infección fágica como causa de la falla de un cultivo monocepa utilizado para una producción de queso Cheddar (Frank y Hassan, 1998).

Los fagos son específicos de un huésped y normalmente atacan sólo cepas muy relacionadas entre sí (Neve, 1996). Se propagan a expensas de sus bacterias sensibles, por lo que cualquier material en el cual ha habido un crecimiento del cultivo puede ser considerado fuente potencial de bacteriofagos (suero de quesería, aguas de lavados de tinajas, leche cruda, aire, equipamiento, etc.) (Hammer y Bohel, 1957). La infección por bacteriofagos conduce a la lisis celular del cultivo iniciador y por lo tanto la fermentación de la lactosa a ácido láctico se detiene. La consecuencia es un retardo o bloqueo en la fermentación, una alteración en la calidad del producto y en casos severos, la pérdida del producto (Brussow, 2001).

Los ataques fágicos ocurren en muchas fermentaciones industriales, pero ni la magnitud ni la persistencia de los mismos, son comparables a los que se dan en el caso de la industria láctea. Si bien existen agentes no virales (antibióticos, aglutininas, ciertas enzimas, bacteriocinas, etc.) que inhiben el desarrollo de los cultivos iniciadores (Neve, 1996), las infecciones fágicas son el mayor problema que se presenta en la manufactura de productos lácteos fermentados (Heap y Harnett, 2002). Esta particular susceptibilidad se debe a que:

- los procesos no se realizan bajo condiciones asépticas ni se conducen en un medio estéril (leche pasteurizada);
- las fermentaciones se llevan a cabo frecuentemente en tinas abiertas;
- a fin de aumentar la producción, se llevan a cabo fermentaciones cortas en varias tinas que se encuentran cercanas, incrementando así las oportunidades de propagación de los fagos;
- se utilizan cepas especializadas que limitan el número y la diversidad de cultivos lácteos iniciadores disponibles;
- se usan continuamente cultivos definidos que proveen de un huésped siempre presente como blanco para el ataque fágico.

(Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Neve, 1996)

Debido al gran riesgo económico asociado, el control de estas infecciones es un punto crítico en el manejo de las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores. Para lograr ese objetivo, es fundamental entender los complejos y dinámicos mecanismos de la interacción fago - huésped, incluyendo: 1) la caracterización de la población fágica involucrada, 2) el análisis de los mecanismos de resistencia al fago, propio de la bacteria, 3) la identificación de los mecanismos de antirresistencia del fago (Josephsen y Neve, 1998).

II.2 Estructura de los bacteriofagos.

Los principios fundamentales que rigen las estructuras víricas fueron predichos por Watson y Crick en 1956, quienes señalaron que en virtud del escaso material genético presente en los viriones, la única forma de construir una cápside era empleando repetidamente el mismo tipo de molécula, y que el mejor modo de ensamblar subunidades idénticas era presentando un arreglo simétrico.

Luego, la microscopía electrónica validó esas predicciones y permitió observar que todos los virus están contruídos por lineamientos geométricos estrictos y obedecen reglas de simetría.

Bradley, 1967.

Básicamente, los virus poseen un núcleo de ácidos nucleicos rodeado por una cubierta proteica. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, pero no ambos, de simple o doble cadena. La cubierta proteica está formada por un ensamblado de subunidades morfológicamente idénticas, las cuales a su vez pueden estar compuestas por un número de unidades más pequeñas, es decir, moléculas individuales o un grupo de moléculas. La cubierta proteica en su conjunto se denomina **cápside** y las subunidades proteicas, **capsómeros**. La partícula vírica puede poseer apéndices unidos o estar recubierta por una envoltura lipídica (virus envueltos). La mayoría de los bacteriofagos carecen de envoltura (virus desnudos) (Stanier y col., 1998).

La partícula viral completa e infectiva se conoce como virión y existe una gran variedad de formas y tamaños.

- Virión helicoidal: subunidades de proteínas idénticas agrupadas en torno a una molécula única de ácido nucleico (genóforo vírico) que ocupa la parte central o un surco interno de la hélice. La estructura helicoidal completa se denomina **nucleoproteína**.
- Virión poliédrico: sus unidades estructurales de proteína se ordenan formando una cubierta habitualmente compuesta por 20 caras triangulares (icosaedro) que rodea al

ácido nucleico vírico. Esta cápside, a diferencia del caso anterior, con frecuencia puede separarse como una estructura intacta del ácido nucleico del virus.

- Virus complejos: compuestos por una estructura poliédrica (cabeza), conectada a una estructura helicoidal (cola) que puede estar rodeada de un tubo externo más grueso (vainas) y presentar elementos adicionales (collar, placa basal, espículas, fibras). Esta combinación se conoce como estructura binaria y es relativamente común entre los fagos (Stanier y col., 1998).

Según Bradley (1967), los bacteriofagos pueden clasificarse en seis tipos morfológicos básicos:

- Grupo A: poseen cabeza hexagonal, que puede o no ser elongada (prolata), cola larga con vaina contráctil. La cola es usualmente rígida y puede poseer estructuras adicionales como fibras o estructuras terminales.
- Grupo B: poseen cabeza hexagonal y cola larga relativamente flexible, sin vaina contráctil, que puede o no poseer estructuras adicionales.
- Grupo C: poseen cabeza hexagonal y cola corta no contráctil, con o sin estructuras adicionales.
- Grupo D: no poseen cola, son cabezas hexagonales con grandes capsómeros o protuberancias en los vértices.
- Grupo E: similares al grupo anterior, aunque sin protuberancias en los vértices.
- Grupo F: poseen una forma filamentosa larga y flexible, sin estructuras unidas de ningún tipo.

Las diferencias fundamentales en las morfologías (Fig. 5), se reflejan en los tipos de ácidos nucleicos (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos morfológicos básicos de bacteriofagos y sus tipos de ácidos nucleicos (Bradley, 1967).

Grupo	Descripción	Tipo de ácido nucleico
A	Cola contráctil	2-ADN
B	Cola larga no contráctil	2-ADN
C	Cola corta no contráctil	2-ADN
D	Sin cola, capsómeros grandes	1-ADN
E	Sin cola, capsómeros pequeños	1-ARN
F	Sin cabeza, filamento flexible	1-ADN

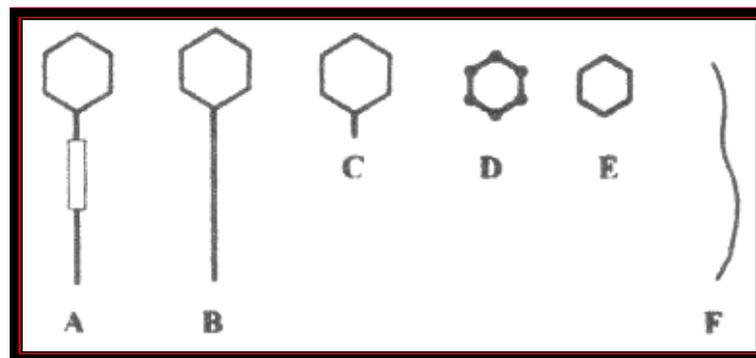


Figura 5. Tipos morfológicos de bacteriofagos (Bradley, 1967).

II.3 Bacteriofagos de bacterias lácticas

Los fagos que infectan bacterias lácticas (Fig. 6) usualmente poseen estructuras binarias con cabezas isométricas o prolatas, en las que se encuentra contenido el ADN lineal de doble cadena (Neve, 1996). La cola es un tubo pequeño que se une a la cabeza, a veces a través de un collar, cuya estructura puede ser rígida o flexible. Su longitud es variable y puede poseer vaina contráctil. La placa basal es una estructura compleja adicional que puede o no estar presente y tiene por función el anclaje del fago a la célula huésped, para lo cual puede además presentar fibras (Frank y Hassan, 1998).

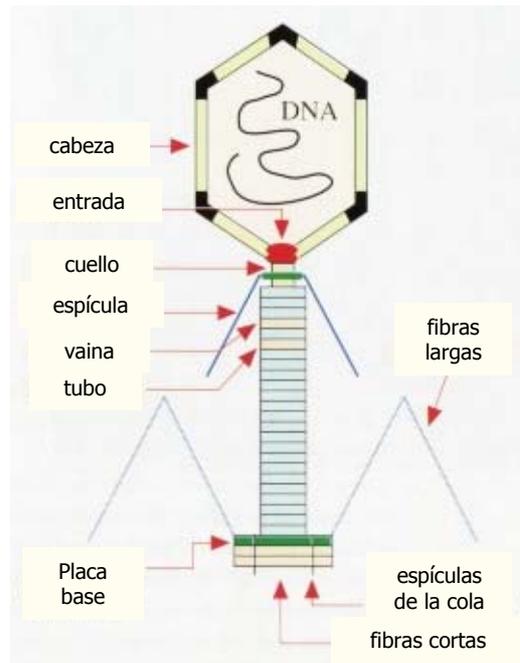


Figura 6. Esquema de la morfología básica de los fagos de bacterias lácticas.

De acuerdo al esquema de clasificación de Bradley, los fagos de bacterias lácticas se agrupan en tres clases principales comprendiendo los morfotipos A (colas contráctiles), B (colas largas, no contráctiles), y C (colas cortas, no contráctiles). Estas tres clases pueden diferenciarse aún más considerando el tamaño y forma de las cabezas, por adición de un número a estas letras: 1 para pequeñas isométricas, 2 y 3 para prolatas pequeñas o grandes, respectivamente. Los tres grupos básicos de bacteriofagos pueden también agruparse en base a la clasificación propuesta por Ackermann y Dubow en 1987, en las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, respectivamente (Fig. 7) (Neve, 1996; Josephsen y Neve, 1998). Según Ackermann (2005), los fagos con cola son los más numerosos y ampliamente distribuidos de todos los virus conocidos, así como también los que muestran una mayor diversidad en sus propiedades (dimensiones y estructuras, composición y contenido de ADN, proteínas, espectro de hospedadores, fisiología, etc.). Han sido agrupados bajo el orden *Caudovirales*, que comprende a las tres familias antes mencionadas, que se diferencian según la estructura de sus colas.

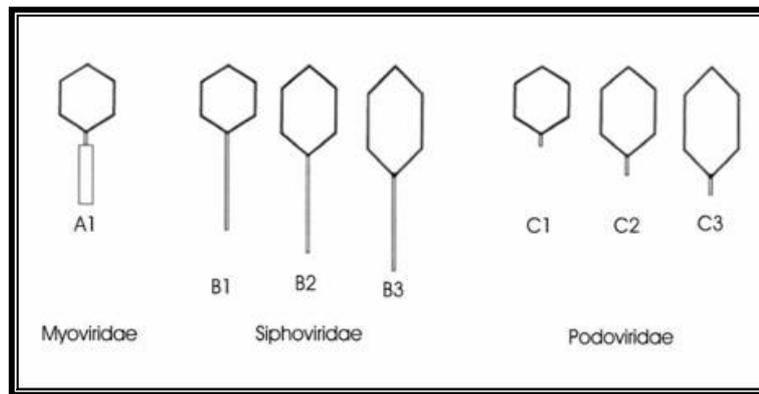


Figura 7. Familias y morfotipos de fagos de bacterias lácticas
(Ackermann y col., 1984).

Todos los genóforos de virus de bacterias lácticas son de ADN doble hebra lineal, pudiendo o no presentar extremos cohesivos. Los extremos cohesivos consisten en una secuencia de unos pocos nucleótidos de longitud de ADN simple hebra, que se encuentran en los extremos del ADN viral. Estas hebras son complementarias entre sí y permiten la circularización del ADN. Algunos fagos poseen moléculas de ADN sin extremos cohesivos, con un tamaño superior al necesario para contener el genoma completo del fago. La misma secuencia corta de nucleótidos se repite en uno y otro extremo, denominándose redundancia terminal. En estos casos, el ADN lineal de distintos fagos individuales, no tiene el mismo inicio ni fin, aún cuando el orden de los genes es el mismo al disponerlos en un mapa físico circular.

II.3.1 Caracterización de bacteriofagos de bacterias lácticas

Los bacteriofagos pueden caracterizarse empleando varios parámetros:

Rango de huéspedes: Es el perfil de lisis de un bacteriofago particular cuando se enfrenta a una variedad de cepas. Este rango caracteriza una relación fago – huésped, que puede ser modificada rápidamente ya sea por cambios del fago o de la cepa. Por ello, muchos autores consideran que los espectros de huéspedes no son constantes y que son poco confiables para la caracterización (Mata y Ritzenthaler, 1988; Neve y Teuber, 1991). Sin embargo, resultan de gran utilidad tecnológica ya que conociendo el grupo de cepas sensibles a un determinado

bacteriofago, se hace posible implementar medidas de control adecuadas (Guglielmotti, 2003).

Morfología: a través de técnicas de microscopía electrónica se pueden determinar características morfológicas (forma y dimensiones de la cabeza y cola), así como la presencia de estructuras características (collar, placa basal, espículas, etc.).

Perfil de proteínas: las proteínas estructurales de las partículas fágicas pueden ser separadas en geles desnaturizantes SDS-PAGE. Los perfiles proteicos resultantes usualmente revelan de 1 a 4 bandas principales y una serie de bandas menores. En general, fagos de diferentes morfologías presentan diferentes perfiles proteicos (Josephsen y Neve, 1998).

Serología: las proteínas estructurales del fago provocan respuestas inmunes y se emplean para obtener anticuerpos mono y policlonales específicos. Luego, estos antisueros pueden emplearse como reactivos en distintas técnicas inmunológicas (ensayos de neutralización, Western Blot, ELISA o microscopía inmunoeléctronica) (Neve, 1996).

Por otro lado, una caracterización genética puede incluir:

Análisis con enzimas de restricción: Los perfiles de restricción específicos de cada bacteriofago se obtienen mediante el uso de endonucleasas de restricción que reconocen y cortan en sitios específicos el ADN de fagos, y su posterior separación de los fragmentos generados por electroforesis en geles de agarosa (Neve y Teuber, 1991).

Determinación de mapas de restricción: por restricción del ADN fágico con una variedad de enzimas de restricción y localizando la posición relativa de los sitios de corte en el genoma, se pueden construir los mapas de restricción o mapas físicos (Neve y Teuber, 1991; Neve, 1996).

Tamaño del genoma: los mapas de restricción genómicos y la estimación combinada a partir de datos obtenidos por microscopía electrónica y tamaños de fragmentos obtenidos por restricción, proveen de la información más confiable con relación al tamaño de los genomas. También pueden estimarse por adición de los tamaños de los fragmentos de ADN de una

digestión con una enzima de restricción particular (aunque este método puede subestimar el tamaño total del genoma) (Davidson y col., 1990; Neve y Teuber, 1991); o determinarse en forma más exacta si se conoce la secuencia del genoma.

Mecanismos de empaquetamiento *cos* / *pac* los fagos se dividen en dos grupos según su empaquetamiento, en base a la presencia o ausencia de extremos cohesivos. El método consiste en comparar los patrones de restricción del ADN viral tratado y sin tratar con ADN ligasa. Si el fago posee extremos cohesivos, aparece un nuevo fragmento en las muestras de ADN ligado al mismo tiempo que desaparecen dos bandas en las muestras no ligadas, siendo la suma de sus tamaños igual al del nuevo fragmento (Guglielmotti, 2003). En cambio, la presencia de fragmentos submolares luego del análisis por restricción, evidencia la presencia del sitio *pac* en el cual se inicia el empaquetamiento del genoma, la ausencia de extremos cohesivos y la homología entre los fragmentos submolares que contienen la redundancia terminal y el área del genoma comprendido entre los sitios *pac* (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Perfil RAPD: esta es una técnica simple (Williams y col., 1990), que se basa en la amplificación de ADN genómico usando como iniciadores oligonucleótidos cortos de secuencia aleatoria. El resultado es un conjunto de fragmentos de ADN en distinto número y tamaño en función del ADN utilizado como molde, pudiéndose obtener polimorfismos sin necesidad de conocer secuencias de nucleótidos específicas.

Hibridización ADN – ADN: estas técnicas son excelentes para determinar la homología de ADN entre bacteriofagos. Las moléculas de ADN doble hebra a comparar se desnaturalizan a ADN simple hebra, luego se mezclan y se permite el reanillado. A fin de detectar la reacción de hibridación, una de las dos moléculas de ADN se marca radioactivamente o se modifica químicamente.

Genes de bacteriofagos: la caracterización y análisis molecular de genes específicos, elementos regulatorios y otras secuencias del genoma fágico, permiten lograr un mejor entendimiento de la organización de los genomas, el control de la expresión génica (tanto en

ciclos líticos como en lisogénicos), y el modo por el cual se sintetizan, ensamblan y liberan los viriones (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Forde y Fitzgerald, 1999).

Secuenciación: la secuenciación del genoma completo del fago ϕ_{x174} en 1977 anunció el inicio de una nueva era en la biología molecular. Por primera vez los investigadores descifraban en forma íntegra las instrucciones genéticas para conformar una entidad biológica (McGrath y col., 2004). El fago LL-H (*Lb. delbruekii* subsp. *lactis*) es el primer fago de lactobacilos cuya secuencia nucleotídica completa ha sido determinada (Alatossava y col., 1998). La facilidad relativa con la cual los genomas completos de los bacteriofagos pueden ser elucidados en la actualidad, ha tenido un profundo impacto en el estudio de los mismos.

Las graves consecuencias económicas de fallas en las fermentaciones han sido la fuerza motriz que hizo de los fagos de bacterias lácticas unos de los más profundamente estudiados en cuanto a la información genómica. Si bien las secuencias de nucleótidos difieren entre los distintos fagos de bacterias lácticas, la organización global compacta de sus genomas parece ser similar, consistiendo en unidades funcionales involucradas en la replicación, morfogénesis, integración y lisis, y además poseen escaso ADN no-codificante (Forde y Fitzgerald, 1999). En la actualidad, se encuentran disponibles 12 secuencias genómicas completas para fagos de lactococos (Moineau y col., 2002). Desiere y col. propusieron un nuevo concepto en la clasificación taxonómica de bacteriofagos que infectan bacterias Gram positivas con bajo contenido de G+C, basado en la organización genómica.

El conocimiento de las secuencias permite elucidar procesos evolutivos y desde un punto de vista aplicado, aporta al entendimiento del ciclo de multiplicación fágica, brindando oportunidades biotecnológicas para nuevos desarrollos en tecnologías de fermentación, para la obtención de cepas de bacterias lácticas fago-resistentes y en bioterapia (Moineau y col., 2002; McGrath y col., 2004).

El grupo de Brussow y col. está generando grandes volúmenes de datos bioinformáticos acerca de los genomas de fagos de bacterias lácticas. Encontraron que los genomas de fagos pertenecientes a la misma especie o grupo comparten un elevado grado de homología (>70%), que el orden de los genes tardíos se encuentra conservado en fagos de la familia

Siphoviridae, que la mayoría de los genomas fágicos se encuentran formados por un mosaico de regiones conservadas espaciadas por secuencias no-homólogas, y que la evolución fágica se produce por medio de mutaciones puntuales, inserciones/deleciones y recombinaciones (Moineau y col., 2002).

II.3.2 Ciclos de multiplicación fágica

II.3.2.1 Ciclo lítico de fagos – crecimiento vegetativo

Los bacteriofagos dependen de células bacterianas metabólicamente activas para la síntesis de sus macromoléculas, debido a que no poseen maquinaria de síntesis propia. Los fagos que infectan y lisan a sus huéspedes se llaman fagos virulentos. La lisis del cultivo resulta en la liberación de nuevos viriones, los cuales pueden inmediatamente infectar más células. Esta propagación se llama ciclo lítico (Fig. 8) de desarrollo fágico (Neve y Teuber, 1991) y puede dividirse en varias etapas:

Adsorción: es el primer paso de la infección y ocurre cuando el fago se adsorbe sobre la superficie celular de una bacteria susceptible (huésped homólogo). Se trata de un evento muy específico, dependiente de la presencia de receptores fágicos apropiados en la pared celular del huésped (Neve, 1996). El reconocimiento del sitio específico de adsorción está mediado por la placa basal, espículas o fibras en el extremo de la cola del fago (Frank y Hassan, 1998).

Frecuentemente, la adsorción ocurre con dependencia de Ca^{2+} ó Mg^{2+} , presentando una primera etapa reversible de unión a receptores presentes en la pared celular, seguida de una interacción irreversible con una proteína localizada en la membrana celular (Frank y Hassan, 1998; Josephsen y Neve, 1998). Se han identificado tanto componentes de naturaleza proteica como hidrocarbonada en los receptores fágicos de bacterias lácticas (Watanabe y Takesue, 1972; Neve y Teuber, 1991; Arendt y col., 1993).

La adsorción en lactococos fue estudiada por microscopía electrónica, observándose diferentes distribuciones de las partículas fágicas sobre la superficie celular: adsorción uniforme de muchos fagos sobre toda la cubierta celular o pocos fagos agrupados sobre un número limitado de receptores sobre la superficie celular (Valyasevi y col., 1991).

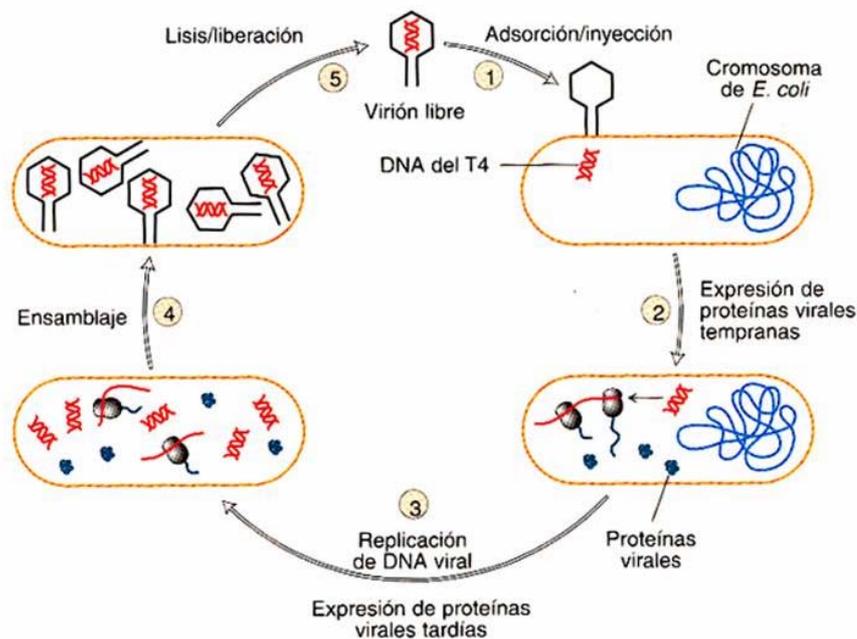


Figura 8. Ciclo de multiplicación de fagos virulentos.

Inyección del ADN fágico: el ADN fágico es inyectado desde la cabeza y a través de la cola hacia el interior de la célula bacteriana, mientras que la partícula fágica vacía (fantasma) permanece en la porción exterior de la superficie bacteriana (Neve y Teuber, 1991). Esta etapa ha sido estudiada en profundidad para el fago PL-1 de *Lb. casei*, observando que el proceso requiere de Ca^{2+} y energía celular (ATP) (Watanabe y Takesue, 1973; Watanabe y col., 1979) y dependería de la maquinaria de síntesis proteica de la célula huésped (Watanabe y col., 1991). Lanni realizó observaciones similares estudiando la adsorción del fago T5 sobre células de *E. coli* (Bradley, 1967), indicando que la inyección sería un proceso complejo y no una simple transferencia de la molécula de ácido nucleico del fago. También en esta etapa, para muchos fagos de bacterias lácticas, Ca^{2+} ó Mg^{2+} resultan indispensables, ya que podrían actuar como contraiones durante la translocación del ADN a través de la membrana celular (Josephsen y Neve, 1998). Particularmente en el caso del fago LL-H (*Lb. delbruekii* subsp. *lactis*) estos iones parecen incluso ser constituyentes de la partícula infecciosa, estabilizando el ADN condensado en la cápside. Ambos serían co-transportados

al interior de la célula infectada, sirviendo como componentes esenciales para la translocación exitosa del ADN viral a través de la membrana citoplasmática (Alatossava y col., 1998).

Maduración de la partícula fágica: luego de la inyección del ADN, el metabolismo normal de la célula infectada se detiene, y comienza la replicación del genoma fágico, transducción a ARN y síntesis de sus proteínas (Neve, 1996; Frank y Hassan, 1998).

Si bien no se conoce mucho con relación al desarrollo intracelular de los bacteriofagos a nivel molecular, existen algunos estudios detallados realizados con fagos de lactococos. En particular, Powell y col. observaron que el fago ϕ c6A infecta a su huésped (*Lactococcus lactis* C6) provocando la degradación de su cromosoma en 4 – 6 minutos post infección. Los productos de degradación son posteriormente empleados como precursores de la síntesis de nuevo ADN fágico (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). En 1991, Casey observó para el fago Tuc2009 (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* UCS26), que las regiones de ADN que se transcriben más tempranamente, no producen un alto número de transcriptos. Especuló que estos genes podrían codificar proteínas encargadas de dirigir la célula a una transición de la síntesis de ARN celular hacia la síntesis de ARN viral. Es probable que las regiones que codifican para una mayor concentración de transcriptos en las etapas más tardías de la maduración, codifiquen para proteínas requeridas para la morfogénesis y empaquetamiento del fago (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Para el fago de lactococo bIL41, sólo los transcriptos tempranos son sintetizados por la ARN polimerasa del huésped, luego la transcripción depende de una proteína codificada por el fago (Brussow, 2001). En cambio, en 1978 Stetter y col. reportaron que la transcripción del genoma completo del fago PL-1 depende de la ARN polimerasa de la célula, que transcribe sobre ambas hebras en direcciones opuestas para incluir la casi totalidad del ADN fágico.

Hacia el final de la etapa de maduración se sintetizan las nuevas proteínas virales. Las proteínas estructurales se ensamblan y el nuevo ADN viral se empaca en forma condensada en las cabezas. Finalmente, se unen las colas para dar lugar a la partícula viral completa (Neve, 1996). El período de tiempo que transcurre entre la infección y la aparición intracelular de las primeras partículas infectivas se define como “eclipse” y está contenido

dentro del período de latencia (tiempo transcurrido desde la adsorción inicial y hasta la liberación de las partículas del fago, durante el cual no se observa modificación del título fágico) (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Si bien el ensamblado de partículas fágicas se produce por mecanismos aún no investigados a nivel molecular (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Brussow, 2001), se ha reportado información relacionada con el empaquetamiento del ADN. Estudios recientes realizados con el fago A2 de *Lb. casei*, identificaron un gen de la enzima terminasa, similar a la del fago λ , que media el empaquetamiento tipo *cos*. De modo análogo, se identificaron en *St. thermophilus* y ciertos lactobacilos, sitios *pac*, genes de terminasa y proteínas que podrían ser similares a terminasas conocidas, que median el empaquetamiento del genoma tipo *pac* (Brussow, 2001).

Lisis de la bacteria huésped: el ciclo lítico se completa cuando la progenie fágica es liberada del interior de la célula huésped. La lisis celular requiere usualmente de la actividad de dos enzimas: una holina, que media la ruptura inespecífica de la membrana celular y que permite el acceso a la pared celular a una lisina. Dos tipos de lisinas fueron encontradas en fagos de bacterias lácticas. Algunos fagos de lactobacilos y lactococos poseen muraminidasas, mientras que los fagos de *St. thermophilus* y ciertos fagos de lactococos, contienen amidasas (Brussow, 2001). Las lisinas fágicas liberadas al medio pueden también causar lisis de células no infectadas e incluso de cultivos resistentes al fago (lisis desde el exterior) (Neve y Teuber, 1991; Frank y Hassan, 1998).

El período durante el cual se produce la liberación de la progenie viral se conoce como **período exponencial** y el número de viriones liberados por célula infectada, *burst size*. El ciclo lítico de un sistema fago – cepa se caracteriza por el período de latencia y el *burst size*, que se determinan en experiencias de crecimiento en un paso (Chow y col., 1988). Ambos parámetros pueden variar drásticamente para distintos sistemas y son dependientes de los factores experimentales (pH, temperatura, etc.). También el estado nutricional del huésped y la disponibilidad de electrolitos pueden influenciar el ciclo de multiplicación fágico (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

II.3.2.2 Lisogenia

Lisogenia es la formación aparentemente espontánea de bacteriofagos a partir de bacterias que parecen libres de ellos. Se transmite de una generación de bacterias a la siguiente por una vía endomicrobiana. Sólo cuando el fago está en el estado de profago vive en armonía con su huésped bacteriano. Luego por algún proceso de inducción, el profago vuelve a ser infectivo”.

Andre Lwoff, 1950 (Helvoort, 1996)

El primer estudio confirmando el aislamiento de cepas lisógenas en bacterias lácticas, fue realizado por Reiter en 1949, trabajando con lactococos. Desde entonces este fenómeno se ha demostrado en lactobacilos y *St. thermophilus*, no así en *Leuconostoc* pertenecientes a ambientes lácteos (Davidson y col., 1990; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

El ciclo lisogénico es una vía alternativa de proliferación fágica (Fig.9). Los pasos de adsorción e inyección del ADN son similares que para el ciclo lítico, pero luego el mismo es integrado por recombinación en el cromosoma bacteriano. El evento ocurre en una región específica de homología entre el ADN fágico y el de la célula, denominados attP y attB, respectivamente. El estado lisogénico está controlado por un número limitado de genes virales (Josephsen y Neve, 1998; Brussow, 2001).

En lugar de producirse la lisis celular, el ADN fágico integrado (profago) se replica en forma sincronizada con el ADN bacteriano sin afectar el metabolismo celular y dando lugar a una progenie de células lisógenas. Tales fagos capaces de producir lisogenia, se denominan temperados. La lisogenia puede mantenerse indefinidamente o bien, los profagos pueden escindirse de las células huésped por inducción con distintos agentes (luz UV, mitomicina C, etc.). El fago temperado liberado de la célula (célula curada) puede relisogenizarla o proliferar como un fago virulento en cepas susceptibles (cepas indicadoras). En general, la lisogenia inmuniza al huésped de infecciones con cepas de bacteriofagos muy relacionados (Neve y Teuber, 1991; Neve, 1996; Frank y Hassan, 1998; Josephsen y Neve, 1998).

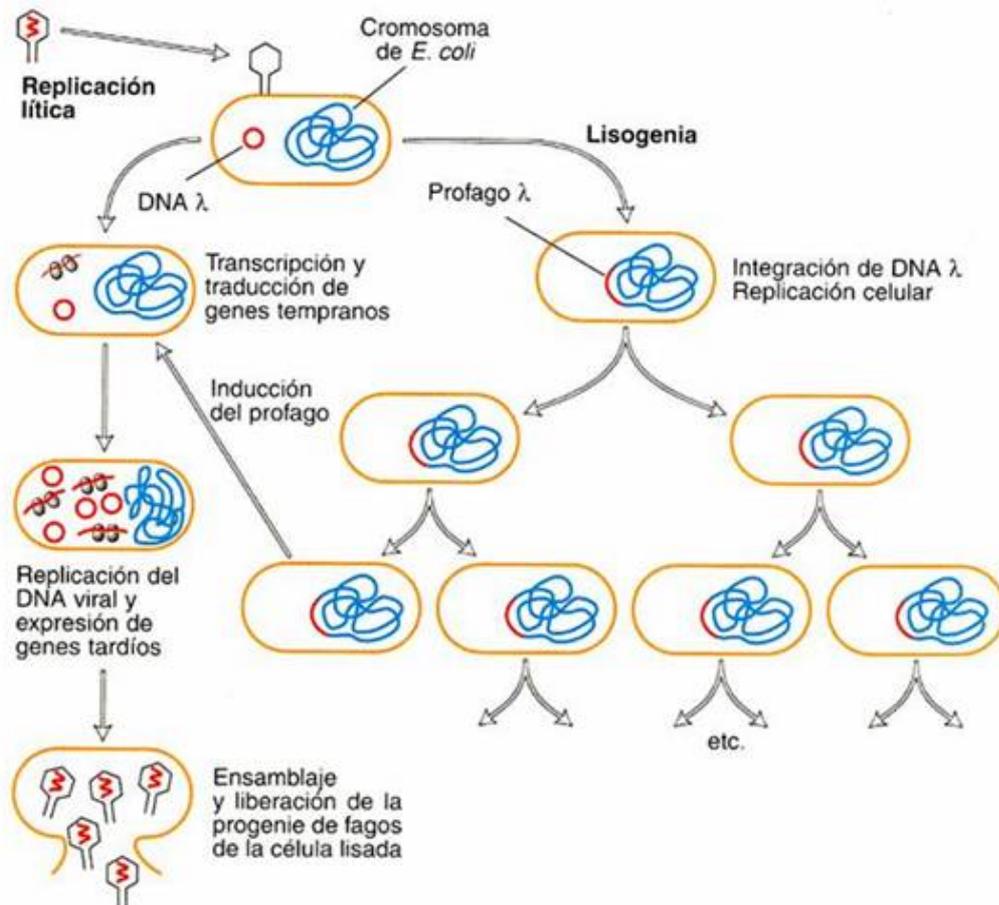


Figura 9. Ciclos lítico y lisogénico de un fago.

La lisogenia se encuentra ampliamente distribuida en las bacterias lácticas. La mayoría de las cepas lisógenas pueden inducirse por tratamiento con luz UV o mitomicina C, aunque las cepas indicadoras que permiten el crecimiento lítico de los fagos inducidos no son, en general, fáciles de identificar. Una forma alternativa de demostrar la presencia de fagos en cultivos inducidos, es la visualización de las partículas infectivas por medio de microscopía electrónica. Los estudios de lisogenia en lactobacilos han sido menos abordados que para lactococos. Estudios realizados por distintos investigadores sobre numerosas cepas de lactobacilos demostraron que mayores frecuencias de inducción se obtuvieron al emplear mitomicina C en lugar de radiación UV y que la lisogenia es un fenómeno común en lactobacilos. Un caso de particular interés y sobre el cual se han llevado a cabo estudios exhaustivos, es el de la cepa lisógena de *Lb. casei* S-1, que alberga el fago temperado ϕ FSW, el cual no puede ser inducido ni por mitomicina C ni por luz UV (Davidson y col., 1990).

El estudio de lisogenia en fagos de bacterias lácticas tiene sentido desde un punto de vista práctico, ya que los huéspedes lisógenos pueden servir de reservorio de bacteriofagos. Se han establecido relaciones genéticas entre algunos fagos líticos y temperados en lactobacilos, lactococos y *St. thermophilus*, aunque la mayoría de los fagos virulentos no están genéticamente relacionados con fagos temperados (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Séchaud, 1988). La lisogenia puede también servir de sistema modelo para el estudio del control y la regulación de la expresión génica en fagos. La información obtenida puede emplearse para la construcción de vectores de integración (Arendt y col., 1993).

II.3.3 Mecanismos de fagoresistencia en bacterias lácticas

Las bacterias lácticas han estado expuestas a fagos a lo largo de miles de años, por lo que han desarrollado efectivos sistemas de defensa contra ellos. En respuesta, los fagos también evolucionaron logrando sistemas de contradefensa para sortear esas barreras (Neve, 1996). El descubrimiento de mecanismos naturales de defensa frente a fagos ha brindado oportunidades de implementarlos en programas de mejoramiento de cepas de cultivos iniciadores.

Los cultivos de lactococos han sido utilizados más intensivamente y en mayor escala que otras bacterias lácticas y consecuentemente han estado en mayor medida expuestos a sufrir infecciones por fagos. Por las mismas razones, han sido más extensamente estudiados (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Desde el trabajo pionero de McKay y Klaenhammer en los '80s, se identificaron muchas cepas de lactococos con plásmidos codificantes de sistemas antifago (Boucher y Moineau, 2001). Estos mecanismos de defensa naturales pueden también estar codificados en el cromosoma (Moineau y Lévesque, 2005) y han sido identificados en otras bacterias lácticas (Everson, 1991). Algunos sistemas que no están codificados en plásmidos, se han encontrado en *St. thermophilus* (Josephsen y Neve, 1998).

La identificación y caracterización de estos sistemas ha conducido a su clasificación en cuatro grupos principales basándose en su modo de acción:

- Interferencia en la adsorción;

- Bloqueo de la inyección del ADN;
- Restricción / modificación;
- Infección abortiva.

Interferencias con la adsorción fágica: En sistemas homólogos fago/huésped, los fagos se adsorben eficientemente sobre las células bacterianas (usualmente >90% adsorción). Algunas cepas resistentes a fagos muestran un bajo porcentaje de unión indicando que el receptor ha sido modificado. En estos casos, la insensibilidad de las cepas al fago es debido a la prevención de la adsorción (Neve y Teuber, 1991). Los determinantes genéticos responsables de este mecanismo, aún permanecen indeterminados (Forde y Fitzgerald, 1999; Moineau y Lévesque, 2005).

La inhibición de la adsorción ha sido atribuida a la falta de receptores fágicos apropiados, o la producción de polímeros hidrocarbonados o proteínas de pared celular que actuarían muy probablemente enmascarando a los receptores o como ligandos competitivos de los receptores fágicos (Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999).

En algunos casos, la microscopía electrónica reveló la presencia de una fina cubierta rodeando a la célula. Adicionalmente, cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular, fueron observados en estas cepas resistentes (Boucher y Moineau, 2001). El plásmido pCI528 de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* UC 503 codifica para la síntesis de un polímero de galactosa y ramnosa que protege al receptor fágico de la célula. Este material que bloquea al receptor se remueve con un tratamiento suave con álcalis, restableciéndose la habilidad de las células de adsorber al fago (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Neve, 1996).

Según la literatura, dos mecanismos han sido implicados en la inhibición de la adsorción:

- El desarrollo de cepas mutantes insensibles a fagos (BIMs, por su sigla en inglés), debido a mutaciones espontáneas en el cromosoma (ver más adelante en **Obtención de cepas modificadas con fagorresistencia mejorada**), o

- La existencia de plásmidos que median la inhibición de la adsorción (Forde y Fitzgerald, 1999).

En casos en donde el bloqueo de la adsorción está mediado por plásmidos, la inestabilidad inherente a la molécula puede conducir al desarrollo de cultivos mixtos de cepas sensibles y resistentes al fago, donde las partículas fágicas no son removidas ni eliminadas y coexisten en el ambiente. La perpetuación de los fagos virulentos en cultivos resistentes se denomina **pseudolisogenia** o **estado portador de fagos** (*phage-carrier state*) y puede explicarse como un balance metaestable entre dos procesos: el curado del plásmido que otorga resistencia al fago, dando lugar a una progenie sensible, y la multiplicación del fago sobre esas células sensibles. Este estado de pseudolisogenia puede limitar el potencial del bloqueo de la adsorción como mecanismo de defensa. A diferencia de otros plásmidos que median mecanismos de fago resistencia, los plásmidos que producen un bloqueo en la adsorción no parecen ser conjugativos (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Forde y Fitzgerald, 1999).

Prevención de la inyección del ADN fágico: Este mecanismo no está aún muy comprendido. Consiste en la prevención de la translocación del ADN viral al interior celular, sin afectar el proceso de adsorción del fago. La translocación del ADN al citoplasma ocurre a través de una interacción irreversible, dependiente de Ca^{2+} y energía, entre el fago o su ADN y la membrana citoplasmática. Aunque la localización genética del fenotipo debe aún ser identificada y caracterizada, se sabe que puede estar presente tanto en cromosoma como en plásmidos (Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999; Moineau y Lévesque, 2005).

Este tipo de mecanismo de defensa se ha encontrado en lactococos y también en *Lb. casei* YIT 9002. En el segundo caso la adsorción celular del ϕ PL-1 ocurre normalmente, pero el ADN viral no es internalizado. Micrografías electrónicas demostraron que en los fagos adsorbidos sobre las células mutantes, el ADN permanece en la cápside, mientras que en las células sensibles, se observa un número creciente de partículas fantasma con el correr de la infección (Watanabe y col., 1984; Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999).

Restricción / Modificación (R/M): Este mecanismo de defensa frente a fagos es activo sólo después de producirse la adsorción del fago y la inyección del ADN viral. El ADN viral es

reconocido por la célula como extraño y es degradado. En ello se encuentran involucradas dos enzimas, una enzima de restricción que hidrolisa el ADN foráneo, y una metilasa que modifica el ADN celular de modo que resulte inmune a la hidrólisis mediada por su propia enzima de restricción (Neve, 1996). El grado de restricción es dependiente del sistema y del fago y en general, la eficiencia de plaqueo (EOP) disminuye logarítmicamente con el incremento de sitios de restricción presentes en el ADN viral (Forde y Fitzgerald, 1999).

Ocasionalmente, el ADN fágico escapa a la restricción, es metilado y da origen a una progenie de fagos modificados que ya no resulta restringida por este sistema R/M en subsiguientes rondas de infección. Esto ha llevado a la consideración de que si bien los sistemas R/M son muy poderosos ya que conducen a la degradación del ADN viral, son inherentemente falibles o permeables y no serían efectivos como mecanismos de defensa (Forde y Fitzgerald, 1999). Sin embargo se observó que sí lo son, cuando se encuentran combinados con mecanismos de defensa complementarios. La combinación de sistemas R/M y abortivos (Abi), que serán explicados a continuación, provee defensas donde la acción del R/M actúa como primera línea, restringiendo el número de infecciones exitosas y permitiendo la supervivencia de la célula; mientras que el mecanismo abortivo previene la proliferación de una progenie fágica nueva o modificada, matando a la célula antes de que se complete el ciclo lítico (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Forde y Fitzgerald, 1999).

Basándose en la complejidad de las estructuras de sus enzimas y a las secuencias de ADN que reconocen y luego clivan, se han conformado cuatro grupos de sistemas R/M: tipo I, II, IIS y III (Forde y Fitzgerald, 1999).

Los sistemas R/M constituyen una presión de selección que afecta a la población de fagos (Boucher y Moineau, 2001). Los bacteriofagos han desarrollado una variedad de mecanismos por los cuales pueden escapar a la restricción de las nucleasas. Entre ellos se incluyen: expresión de proteínas que inhiben a las endonucleasas del huésped, modificación de su propio ADN por metilasas codificadas en sus genomas, otras modificaciones (glicosilaciones, incorporación de bases inusuales) de sus genomas, y reducción selectiva en el número de secuencias presentes en el ADN viral reconocidas por las enzimas de restricción del huésped.

Particularmente para fagos de lactococos, la dificultad que se presenta para lograr la digestión de sus genomas, podría ser un signo de su evolución y persistencia en virtud de la amplia distribución que presentan los sistemas R/M en estas bacterias. También en lactococos, fue posible aislar y caracterizar a dos fagos insensibles a la restricción por un R/M determinado, porque habían incorporado a sus genomas una metilasa bacteriana específica y diferente. Este tipo de protección contra la restricción no es genérico, y estos fagos permanecen aún susceptibles a la restricción por sistemas R/M de diferente especificidad (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

La presencia de sistemas R/M en lactococos ha sido bien establecida. Estudios genéticos revelaron que sus actividades R/M se encuentran comúnmente codificadas en plásmidos (con muy pocas excepciones de determinantes cromosomales), algunos de los cuales son conjugativos. Estas características han contribuido a:

- la amplia distribución de R/M de diferentes especificidades,
- la presencia natural de diferentes R/M en una misma cepa (esa combinación aumenta notoriamente el nivel de protección frente a distintos fagos),
- la inestabilidad y variabilidad genética de los lactococos en la susceptibilidad y resistencia frente a fagos (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Los sistemas R/M han sido también detectados en otras bacterias lácticas, tanto codificados en plásmidos (*Lb. helveticus*, *St. thermophilus*) como en cromosoma (*Lb. delbruekii lactis*, *St. thermophilus*). Incluso en ciertas cepas termófilas, las actividades de sus sistemas R/M no se vieron afectadas por temperaturas elevadas (60°C para *Lb. helveticus* y temperaturas óptimas de actividad entre 37 y 55°C para *St. thermophilus*). Esto presenta posibilidades interesantes para el uso de este mecanismo de defensa en fermentaciones de elaboración de yogur (Boucher y Moineau, 2001), o podría resultar potencialmente útil para modificar por ingeniería genética, lactococos mesófilos empleados en la manufactura de quesos de pasta cocida (Forde y Fitzgerald, 1991).

Infeción Abortiva (Abi). Es un término colectivo que comprende un amplio rango de defensas que actúan luego de la adsorción fágica y de la inyección del ADN. Estos sistemas incluyen mecanismos que interfieren con la replicación del genoma fágico, transcripción, traducción a proteínas, empaquetado del ácido nucleico o ensamblado de las partículas fágicas. La resistencia mediada por Abi culmina típicamente con la muerte de la célula infectada debido a que el ciclo lítico es abortado luego de que ya ha progresado hasta un punto sin retorno; sin embargo, el sacrificio de una célula individual es insignificante en la medida que el nivel de fagos no aumente. Los sistemas Abi son muy efectivos como mecanismos de resistencia ya que la mayoría de los fagos quedan atrapados en el interior celular, haciendo limitada su diseminación (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Forde y Fitzgerald, 1999; Moineau y col., 2002).

La manifestación fenotípica de un Abi se ve como una reducción del EOP y como ausencia de placas o un desarrollo de placas más pequeñas, debido a disminuciones en el *burst size*. Estos sistemas se encuentran ampliamente distribuidos, habiéndose caracterizado más de 20 Abi diferentes en lactococos. Cada Abi requiere de uno o dos genes para su expresión y pocas similitudes han sido observadas entre ellos. Estos genes se caracterizan por poseer un contenido de G+C atípicamente bajo en comparación de los genes de lactococos, sugiriendo la posibilidad de una transferencia genética horizontal desde otra especie de bajo contenido G+C. En estudios de predicción, casi todas las proteínas parecen poseer localización citosólica, pero aún se conoce poco acerca de su modo de acción. En 1992, se reportó la posible existencia de un mecanismo Abi en *St. thermophilus* (Forde y Fitzgerald, 1999; Moineau y Lévesque, 2005).

Dependiendo de si su acción se produce previa o simultáneamente a la replicación del ADN, o luego de que ha ocurrido este evento, los Abi pueden clasificarse como tempranos o tardíos, respectivamente. Entre los que se clasifican dentro de la segunda categoría, sólo en unos pocos casos el blanco específico o el efecto sobre la célula, ha sido identificado.

Los determinantes genéticos se encuentran mayormente en plásmidos, con unos pocos codificados en el cromosoma (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). En general, al aumentar el número de copias de los genes que codifican para Abi, se incrementa la eficacia del

mecanismo de resistencia. Sin embargo, en algunos de estos sistemas, no es posible sobreexpresar constitutivamente al gen, sugiriendo que existe una ajustada regulación y que la proteína codificada podría ser tóxica para la célula (Forde y Fitzgerald, 1999).

Los sistemas Abi se encuentran frecuentemente ligados a otros mecanismos (R/M, inhibición de la adsorción, o de la inyección de ADN o incluso con otro sistema Abi) en una misma cepa y sólo actúan en aquellos casos en los cuales no puede lograrse el bloqueo de la infección fágica en etapas anteriores del ciclo lítico. De ese modo se logra minimizar la incidencia de muerte celular que se observa en los sistemas Abi (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Neve, 1996; Josephsen y Neve, 1998). Por ejemplo, el plásmido conjugativo pNP40 codifica para tres sistemas de resistencia fágica diferentes, dos de los cuales son Abi y un tercero, que inhibe la inyección del ADN (Josephsen y Neve, 1998). El primer sistema Abi identificado fue designado originalmente "Hsp", ilustrando su sensibilidad a la temperatura. La disminución en la actividad que se manifiesta a altas temperaturas, fue también observada para otros sistemas Abi de lactococos (Josephsen y Neve, 1998). Este sistema se encontró en *Lc. lactis* subsp. *Lactis* ME2, que además posee genes para la inhibición de la adsorción, dos sistemas R/M y otro Abi adicional (Forde y Fitzgerald, 1999).

II.3.4 Pared celular

El estudio de paredes celulares en *Lactobacillus casei* se remonta a unos 50 años atrás investigando sus componentes, el modo de unión, las estructuras y las propiedades serológicas relacionadas (Knox y Brandsen, 1962; Hall y Knox, 1965; Knox y Hall, 1965a,b). Aún continúa siendo objeto de investigación, abordando su estudio desde aspectos inmunológicos relacionados con sus propiedades probióticas (de Ambrosini y col., 1996; Matsuguchi y col., 2003). Desde el punto de vista tecnológico, otros trabajos (Yokokura, 1971; Watanabe y col., 1977; Yokokura, 1977; Ishibashi y col., 1980; 1982) se han encarado a fin de descubrir los receptores, presentes en la pared celular, que permiten la adsorción de fagos específicos.

La pared celular juega un rol esencial en muchos aspectos de la fisiología de las bacterias lácticas. No se comporta sólo como un exoesqueleto que contiene al material

intracelular, sino que además actúa como una superficie de intercambio con el entorno. Diversas funciones fisiológicas pueden asignársele, las cuales contribuyen a atributos tecnológicos y relacionados con la salud. Por mencionar algunos: la actividad de los receptores fágicos se relaciona con la presencia de sustituyentes específicos en los ácidos teicoicos y polisacáridos, la resistencia de la bacteria al estrés depende de genes involucrados en la biosíntesis de peptidoglicano y ácidos teicoicos, la autólisis es controlada por el grado de esterificación de los ácidos teicoicos con D-alanina, la inmunoestimulación de la mucosa puede resultar de interacciones entre las células epiteliales y el peptidoglicano o los ácidos teicoicos (Delcour y col., 1999).

La pared celular de bacterias lácticas posee la estructura típica presente en las bacterias Gram positivas. Está compuesta por un grueso saco de múltiples capas de peptidoglicano decorado con proteínas, ácidos teicoicos y polisacáridos y rodeado en algunas especies por una cubierta de proteínas formando una capa paracrística (S-layer). Si bien dos son los componentes principales (la capa de peptidoglicano y los ácidos teicoicos) (Heaton y Neuhaus, 1994), pueden presentarse cuatro componentes:

- peptidoglicano, también llamado mureína
- ácidos teicoicos
- S-layer
- polisacáridos (Delcour y col., 1999).

El **peptidoglicano** (PG) envuelve al contenido de la bacteria como una red, manteniendo la integridad estructural de la célula. Es básicamente un polímero de N-acetilglucosamina, cuyas cadenas se encuentran unidas entre sí por enlaces covalentes. La malla de la red está formada por dos segmentos paralelos prácticamente inextensibles, de naturaleza glicosídica, mantenidas unidas por dos puentes peptídicos pequeños y elásticos, que permiten la expansión o encogimiento de la red. De este modo, la superficie completa es

una gran macromolécula cerrada y unida covalentemente, con una notable elasticidad y resistencia a la tensión (Delcour y col., 1999).

Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa pared (usualmente de 50 nm), que les permite soportar presiones de turgencia del orden de las 20 atm. En este caso, varias capas concéntricas de PG se mantienen unidas por enlaces covalentes radiales que refuerzan la estructura en su conjunto.

En las bacterias lácticas, las cadenas glicosídicas del PG están formadas por un polímero de un disacárido de N-acetil-glucosamina- β (1-4)-N-acetil-ácido murámico. Los puentes que entrecruzan estas cadenas son pentapéptidos que usualmente alternan L- y D-aminoácidos. La secuencia consenso es L- alanina/D- glutamato/meso- ácido diaminopicolínico o L- lisina/D- alanina/D- alanina. En varias especies o cepas de enterococos y lactobacilos, el residuo D-alanina terminal es reemplazado por D-lactato o D-serina, lo cual les confiere resistencia frente al antibiótico vancomicina (Delcour y col., 1999).

Se denomina como **ácidos teicoicos (AT)** a una familia de polímeros aniónicos químicamente diversos, compuestos de unidades repetidas de alditol fosfato con sustituyentes (por ej., ésteres de D-alanina, residuos de glucosa) unidos a las funciones alcohol del esqueleto carbonado (Heaton y Neuhaus, 1994). La pared celular de la mayoría de las bacterias Gram positivas posee AT, los cuales representan más del 50% del peso de la pared. Estos componentes, de gran importancia para la funcionalidad de la pared celular, fueron descubiertos hace casi 50 años en extractos bacterianos de *Lb. arabinosus* (actualmente *Lb. plantarum*). Los AT son sintetizados en la superficie externa de la membrana citoplasmática, y su tamaño y propiedades fisicoquímicas son compatibles con una configuración extendida a través de la pared celular. Los AT son muy diversos en estructura y abundancia, dependiendo de la cepa o especie, estadio o velocidad de crecimiento, pH del medio, fuente de carbono, etc. (Delcour y col., 1999).

Dentro de esta familia, se encuentran:

- Los AT y los teicurónicos (ATU): se denominan en forma genérica “ácidos teicoicos de la pared” por estar unidos covalentemente al PG.

Los AT poseen una estructura global en donde una cadena de residuos ribitol o glicerol unidos por enlaces fosfodiéster, se enlaza con una “unidad de ligación terminal” que permite la fijación covalente al PG.

Los ATU libres de fosfatos han sido descritos sólo en unas pocas especies, especialmente de *Bacillus*, aunque es posible que se encuentren presentes también en bacterias lácticas. Su estructura difiere de la de los AT en dos aspectos: la cadena principal está formada por monómeros de hidratos de carbono, directamente unidos por enlaces glicosídicos, y no presentan unidad de ligación para fijarse al PG (Delcour y col., 1999).

- Ácidos lipoteicoicos (ALT) y lipoglicanos (LG): pueden permanecer unidos a la membrana citoplasmática gracias a sus anclajes lipídicos, pero una fracción se encuentra libre en la pared o incluso liberada al medio.

Los ALT se encuentran ampliamente distribuidos en las bacterias lácticas y se encontraron en enterococos, lactococos, lactobacilos, estreptococos y leuconostocs. Los ALT con una cadena principal de poli (glicerol fosfato) representan el tipo más común de polímero aniónico anclado a la membrana y se descubrieron por primera vez en *Lb. fermentum*. Si bien la síntesis de los ALT se inicia con el anclaje a la membrana y así continúan hasta el final, una fracción puede ser liberada. Estas cadenas “secretadas” son heterogéneas y se agrupan en diferentes tipos de micelas, contribuyendo a la formación del glicocálix, o son liberadas al medio (Delcour y col., 1999).

Los ácidos teicoicos de la pared no están presentes ni en *Lb. casei* (Heaton y Neuhaus, 1994), ni en *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KH (Valyasevi y col., 1990), y la carga aniónica del envoltorio celular se debe exclusivamente a los ALT.

Los AT contribuyen en muchos aspectos a la funcionalidad de la pared celular como fuentes de fosfatos, en la captura de cationes (Mg^{2+}) y generando gradientes de pH a través de la pared. Además, influyen en la actividad de autolisinas y están involucrados en la adsorción fágica. Los ALT contribuyen como principal componente a la hidrofobicidad de las envolturas celulares, influyendo en la capacidad de adhesión de la bacteria a células. Son potentes inmunógenos y pueden considerarse el equivalente a los lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas (Delcour y col., 1999; Matsuguchi y col., 2003).

Las principales cadenas de AT y ALT se encuentran decoradas con glicosil o D-alanil, los cuales brindan una gran contribución a la funcionalidad de estos polímeros y se evidencia por los fenotipos de cepas con cambios genéticos que alteran los procesos de sustitución. Se demostró que la glucosilación de AT es necesaria para la adsorción de cierto tipo de fagos en *Bacillus subtilis* y que la pérdida de glucosilación en un AT de poli (ribitol fosfato) confiere fagorresistencia en un mutante de *Lb. plantarum* (Delcour y col., 1999).

Se denomina como *S-layer* al envoltorio bacteriano que puede comprender una o dos capas superficiales superpuestas compuestas por subunidades proteicas, a veces glicosiladas, en un arreglo de monocapa hexagonal o tetragonal paracristalina. En bacterias lácticas, las *S-layer* sólo han sido encontradas en el género *Lactobacillus* y se han estudiado con algún detalle para *Lb. helveticus*, *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus*, y *Lb. crispatus*. El enrejado de *S-layer* se encuentra fuertemente anclado al PG, aunque no en forma covalente.

La contribución de la *S-layer* a la funcionalidad de la célula permanece elusiva, a pesar de los intensos estudios realizados hasta el momento. Varias funciones probables han sido invocadas: factor de virulencia en especies patógenas, acción de tamiz para permitir la retención de macromoléculas útiles o la exclusión de hidrolasas, enmascaramiento de receptores fágicos, factor de adhesión (Delcour y col., 1999).

Los **polisacáridos** son componentes ubicuos del envoltorio celular. Se los suele denominar polisacáridos neutros para diferenciarlos de los polisacáridos aniónicos de los AT, a pesar de que pueden también ser ácidos si se encuentran ramificados con sustituyentes aniónicos, en particular glicerol fosfato.

Entre los polisacáridos pueden distinguirse las siguientes categorías:

- Polisacáridos capsulares: conforman una gruesa cubierta íntimamente asociada y frecuentemente unida por enlace covalente, a la pared celular. Las cápsulas han sido extensamente estudiadas ya que contribuyen a la virulencia de muchos patógenos. Pueden presentar una gran diversidad en la composición de hidratos de carbono presentes en distintas cepas.
- Polisacáridos de la pared celular: decoran el envoltorio celular, pudiéndose encontrar unidos covalentemente o asociados en forma laxa al PG. Se trata de estructuras complicadas que difieren en la naturaleza de los monómeros de azúcares, en el modo de unión, ramificación y sustitución. Además, más de un tipo de polisacáridos de pared pueden coexistir en una misma cepa, sus estructuras pueden ser cepa-dependientes y su composición puede también variar con las condiciones de crecimiento (Delcour y col., 1999). Para ciertas cepas de *Lb. casei* subsp. *ramnosus* (actualmente *Lb. ramnosus*), se observaron cambios considerables en la producción de sus polisacáridos de pared, e incluso en polisacáridos capsulares, debido a la disponibilidad de distintos componentes hidrocarbonados en el medio (Wicken y col., 1983).

La contribución de estos polisacáridos a la funcionalidad de la pared celular aún no está debidamente comprendida, especialmente en bacterias no patógenas, como es el caso de las bacterias lácticas. Probablemente su principal función benéfica radique en mediar interacciones con componentes del medio externo. Pueden participar en interacciones no-específicas con superficies inertes por su aporte a las características fisicoquímicas de la pared celular y también comportarse como receptor de lectinas específicas, mediando la adhesión de otros microorganismos o a células eucariotas

(como en el caso de lactobacilos que colonizan el intestino). La adsorción fágica casi siempre involucra a los carbohidratos de pared celular (Delcour y col., 1999). La interacción específica de fagos con los polisacáridos de pared, ha sido demostrada en *Lb. plantarum*, *Lb. casei* (Ishibashi y col., 1982) y *Lc. lactis* (Valyasevi y col., 1990). En bacterias lácticas, la ramnosa se encuentra muy frecuentemente como constituyente de polisacáridos de la pared, en particular en lactobacilos y estreptococos (Delcour y col., 1999). En *Lb. casei* ATCC 27092 además están presentes la D-glucosa y N-Acetil-galactosamina por fuera de la pared de PG. Mediante el empleo de lectinas, Ishibashi y col. (1982) confirmaron que el receptor para el fago PL-1 está conformado por L-ramnosa como componente principal y D-glucosa, como parte también integrante de tal receptor en la bacteria.

- Exopolisacáridos (EPS): son liberados al medio, no se encuentran unidos como las cápsulas, pero al igual que éstas, presentan una gran diversidad. En particular en bacterias lácticas filantes que producen un rango de EPS de diferentes texturas de gran interés tecnológico (Delcour y col., 1999).

II.3.5 Estrategias para el control de bacteriofagos

Dentro de las industrias fermentativas, la industria láctea es por lejos la más susceptible al ataque de bacteriofagos. Dos vías principales se han identificado como responsables de la contaminación con fagos de este ambiente: los cultivos iniciadores lisógenos y la leche cruda (Neve, 1996). En el primer caso, muchas de las cepas de los cultivos iniciadores empleados en la industria son lisogénicas. Ocasionalmente, el profago puede ser liberado del cromosoma bacteriano y si la partícula se encuentra intacta y encuentra una cepa sensible, se multiplica y se establece en el ambiente industrial (Heap y Harnett, 2002). Por otro lado, las fermentaciones no se llevan a cabo en condiciones asépticas, ya que la leche usualmente es pasteurizada y no esterilizada. Además, se sabe que los fagos sobreviven a los tratamientos de pasteurización, e incluso en el caso de muchos quesos tradicionales, el empleo de leche cruda sin tratamientos térmicos es muy frecuente (Moineau, 1999).

Otro origen posible es el mezcla diversas de fagos existentes en la planta, que frente a la introducción de un nuevo cultivo iniciador, pueden modificarse (mutación o recombinación) y dar lugar a la aparición de un fago distinto que ataque al nuevo huésped (Heap y Harnett, 2002).

Los fagos de bacterias lácticas se encuentran siempre presentes en el ambiente de la industria. Poseen un corto período de latencia y un *burst size* relativamente grande que les permite diseminarse rápidamente en la planta, por lo que su monitoreo constante es esencial. El objetivo debe centrarse en el control de la proliferación fágica y no en la erradicación de los mismos. Para ello, deben tomarse medidas con relación al diseño de la planta, sanitización, ventilación, medios de propagación de los cultivos iniciadores, rotación de cultivos y empleo de cultivos fago-resistentes (Neve, 1996; Josephsen y Neve, 1998; Moineau, 1999). A continuación, se describen diferentes estrategias para minimizar la aparición de problemas relacionados con la presencia de fagos en el ambiente industrial.

Cultivos iniciadores

Actualmente, debido a las exigencias de productos de calidad uniforme, la estandarización de los procesos y la mayor demanda de productos lácteos, las industrias deben trabajar con mayores volúmenes de leche y en determinados casos, en forma continua, maximizando el riesgo de ataques fágicos. Esta evolución ha determinado el reemplazo de los fermentos naturales por *starters* constituidos de unas pocas cepas seleccionadas (fermentos comerciales) que aseguren velocidades de acidificación constantes (Moineau, 1999; Suárez y col., 2002). Los fermentos naturales, por poseer una complejidad microbiana superior y una constante presión de selección, presentan mayor autoprotección frente a fagos líticos. En cambio, los comerciales resultan generalmente más sensibles (Reinheimer, 1994).

Si se trata de fermentos multicepa, la desaparición de alguna de las cepas puede ser compensada por la actividad de las restantes. En el caso extremo de fermentos monocepa, si ingresa un fago lítico al cual la cepa es sensible, conducirá indefectiblemente a la lisis gradual del cultivo y en consecuencia, a la pérdida de su capacidad acidificante (Reinheimer, 1994).

Para cultivos probióticos, tanto mono como multicepas, el resultado es aún más grave. La cepa probiótica sensible lisará en presencia de su fago específico, por lo que no contribuirá a las propiedades probióticas del producto final obtenido.

Limitación de las etapas de propagación de los cultivos

Considerando que la proliferación fágica requiere de células en activa multiplicación, disminuyendo el número de propagaciones por las que atraviesa el cultivo, también se reduce la posibilidad de propagación de fagos potencialmente presentes en el sistema. Los **cultivos de inoculación directa** (DVS - *direct vat set*) son muy activos y no requieren de propagación previa en el laboratorio, por lo que resultan muy convenientes. Como contrapartida, presentan ciertas desventajas ya que, al estar integrados por células en estado de latencia, tienen una fase *lag* prolongada (30-60 min), aumentando los tiempos para alcanzar los niveles necesarios de acidez durante la elaboración. Además, presentan altos costos de distribución y almacenamiento (a temperaturas muy bajas). Existe otro tipo de cultivos menos costosos, pero también menos activos por lo que requieren de una serie de propagaciones previas, que se denominan **cultivos de inoculación semidirecta**. Al presentar un número mayor de generaciones bacterianas, aumenta el riesgo de una potencial contaminación del fermento (Klaenhammer, 1984; Reinheimer, 1994; Sandine, 1996; Frank y Hassan, 1998).

En el caso de cepas probióticas que se propagan durante la elaboración del producto, muchas veces es necesario enriquecer los medios ya que su crecimiento en leche es en general inadecuado, como se mencionara ya anteriormente. Aún así, en algunos casos las fermentaciones son muy largas, incluso de varios días, lo que las convierte en un cultivo sumamente vulnerable al ataque fágico.

Medios inhibidores de fagos

La obtención y preparación del fermento empleado luego como *starter*, se realizan previo a su inoculación en la tina de fermentación. Si bien se realiza en un sistema cerrado, no es totalmente aséptico y en consecuencia, el cultivo puede ser atacado por fagos. A fin de evitar esa situación, se han diseñado medios que contienen fosfatos o citratos que secuestran

caciones divalentes, especialmente el calcio. La proliferación de la mayoría de los fagos se impide, o retrasa, en ausencia de calcio (Guglielmotti, 2003).

Los medios comerciales inhibidores de fagos (PIM, por su sigla en inglés) presentan amplia variación en su capacidad en prevenir la proliferación fágica, siendo los más efectivos aquéllos que contienen suficientes nutrientes para superar las características inhibitorias de este tipo de medios y los que contienen buffers de citrato. No todos los fagos son inhibidos en ausencia de calcio, por lo que para ser efectivos estos medios deben ser empleados sólo como parte de una estrategia global de control (Frank y Hassan, 1998). Además, esta alternativa presenta la desventaja que, si bien el fago no se propaga y no puede aumentar su número durante la preparación del *starter*, la situación cambia al disponer del calcio presente en la leche luego de la inoculación (Heap y Harnett, 2002).

Otro importante desarrollo en la formulación de medios lo constituyó el control de pH gracias al agregado de fosfatos insolubles. Estos se solubilizan y neutralizan el ácido láctico producido debido al crecimiento del *starter*, impidiendo que el pH caiga por debajo de 5,2-5,3. Además de exhibir una excelente inhibición fágica, se estimula la actividad y el desarrollo óptimo de la cepa (Neve, 1996; Sandine, 1996).

Tratamientos térmicos

Es recomendable llevar a cabo un tratamiento térmico a la leche o medio empleados para la preparación del *starter* en el mismo tanque en el cual el cultivo será propagado y por al menos 30 minutos a 85°C. Durante el enfriamiento, es esencial que el aire sea filtrado por medio de filtros adecuados que impidan el ingreso de fagos al tanque (Neve, 1996).

En general, los fagos de bacterias lácticas resisten a tratamientos de pasteurización, por lo que su completa remoción de la leche no es posible por esta metodología (Quiberoni y col., 1999a; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003a; Capra y col., 2004).

Rotación de cultivos

Este sistema, ampliamente utilizado, se basa en la especificidad que rige la interacción célula hospedadora-fago. Requiere de la disponibilidad de un número suficiente de cepas

con diferente sensibilidad frente a fagos. Estas cepas se usan según un esquema de rotación para mantener reducido el nivel de fagos que eventualmente puedan ingresar al sistema y atacar a los cultivos (Reinheimer, 1994; Moineau, 1999). La rotación de cultivos no impide la proliferación fágica, pero si la concentración logra mantenerse por debajo de 10^4 ufp/ml, la acidificación no se ve afectada (Frank y Hassan, 1998).

Esta metodología presenta desventajas en cuanto a la dificultad de encontrar cepas insensibles a fagos, falta de uniformidad del producto y a la gran diversidad de fagos presentes en la planta debido a las diferentes cepas circulantes. Este último punto trae como consecuencia, un incremento en el potencial de recombinación genética entre los fagos presentes en el ambiente industrial (Moineau y Lévesque, 2005). Klaenhammer y col. patentaron el sistema PDRS (*phage defense rotation strategy*), que supera estos inconvenientes y se basa en el uso de variantes isogénicas, obtenidas por incorporación de distintos plásmidos codificantes para sistemas de resistencia a fagos en una cepa parental. Para poder aplicar este tipo de estrategias es necesario disponer de un número considerable de poderosos sistemas anti-fago (Moineau, 1999).

Otra alternativa puede ser la rotación o diversificación en el esquema de producción, es decir, elaborar distintos tipos de quesos en la misma planta, de modo tal que los cultivos *starters* utilizados sean distintos. De esta manera, se produce una dilución de los fagos específicos que existen dentro de la planta (Moineau, 1999).

Esta estrategia de rotación de cultivos es inaplicable al caso de bacterias probióticas, en donde las propiedades son cepa-específicas y se encuentran científicamente demostradas para una cepa en particular, por lo que resulta difícil, sino imposible, reemplazarlas en una estrategia de rotación. Sí podría resultar adecuada una estrategia del tipo PDRS, pero para intentar ese desarrollo se requiere de un gran conocimiento a nivel genético molecular de las cepas.

Higiene de la planta

El uso de tinas cerradas es recomendable siempre que sea posible. Es esencial contar con un estricto programa de limpieza. Las tinas, cañerías y cualquier equipamiento en contacto con la leche, deben ser cuidadosamente limpiados y sanitizados antes de ser utilizado, ya sea con

vapor o con agentes químicos (Neve, 1996; Heap y Harnett, 2002). Tanto el hipoclorito de sodio como el ácido peracético son adecuados a tal fin, ya que rápidamente eliminan partículas fágicas (Binetti y Reinheimer, 2000), siendo el ácido peracético el más efectivo en la inactivación de fagos de bacterias lácticas (Quiberoni y col., 1999a; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003a; Capra y col., 2004). Los equipamientos lavados con hipoclorito no deben ser enjuagados ya que podrían contaminarse con fagos. El cloro residual se inactiva en contacto con la leche. El enjuague de las tinas con hipoclorito entre elaboraciones, es altamente recomendado (Neve, 1996). Tampoco el ácido peracético necesita enjuague, ya que luego de reaccionar con la materia orgánica se descompone dando oxígeno y ácido acético o sus sales (Schröder, 1984).

Los fagos son también sensibles a condiciones de pH extremas ($\text{pH} \leq 4$ ó $\text{pH} \geq 11$) (Moineau y Lévesque, 2005), mientras que el alcohol isopropílico posee muy escaso poder viricida (Suárez y col., 2003).

Para el caso de bacterias probióticas, la higiene de la planta y del proceso es uno de los pocos puntos posibles de control frente a las infecciones fágicas.

Diseño de la planta

A fin de minimizar los incidentes debidos a ataques fágicos, las distintas áreas de procesamiento (recepción de la leche, sala de preparación de fermento, producción y áreas de procesamiento del suero) deben encontrarse físicamente separadas. Además, deben considerarse:

- Tomar precauciones para evitar contaminaciones cruzadas entre los medios de crecimiento, los subproductos de la fermentación y el equipamiento de la planta;
- Proveer de presión positiva de aire filtrado a la sala de preparación de fermentos;
- Planificar adecuadamente la disposición de cañerías de producción para evitar contacto entre sustrato (leche) y efluentes como agua y suero (medio fundamental de diseminación de partículas fágicas en el ambiente) (Everson 1991; Heap y Harnett, 2002; Moineau y Lévesque, 2005).

Por otro lado, la coexistencia en una misma planta de diferentes líneas de producción que emplean fermentos naturales y comerciales, incrementa los riesgos de sufrir ataques fágicos (Suárez y col., 2002), ya que los fermentos naturales (suero fermentos y leche fermentos) contienen una alta concentración fágica y pueden encontrarse incluidas cepas lisógenas (Reinheimer, 2005).

Cepas insensibles a bacteriofagos (cepas salvajes)

Existen ciertas cepas que resisten los constantes ataques de todo tipo de fagos, manteniendo la resistencia por períodos de tiempo prolongados. Esta resistencia puede ser una característica innata de la cepa, la cual puede poseer de manera natural los mecanismos de defensa necesarios para comportarse insensibles frente a los ataques fágicos (Guglielmotti, 2003).

Si estas cepas además de exhibir una fago-resistencia prolongada, presentan características tecnológicas adecuadas, pueden ser aisladas en forma rutinaria de los fermentos mixtos comerciales o de fermentos naturales. Históricamente, estos cultivos se utilizaban continuamente para la elaboración artesanal de quesos, sin ningún tipo de protección contra la contaminación por fagos. Este “ambiente” creado durante las elaboraciones, derivó en una continua selección natural de aquellas cepas que fueran resistentes a los fagos (Klaenhammer, 1984). Se han aislado cepas resistentes a fagos a partir de cultivo mixtos que mantienen actividad, soportando bajos niveles de fagos en su composición (Frank y Hassan, 1998).

En ciertas plantas industriales destinadas a la obtención de productos artesanales, el uso ininterrumpido de un mismo *starter* por períodos de tiempo prolongados, ha permitido mantener el proceso bajo control, sin que se presenten inconvenientes derivados del ataque por fagos. Sin embargo, recientemente se han encontrado bacteriofagos capaces de infectar las cepas que conforman el fermento, lo que confirma la evolución de nuevos fagos líticos a partir de fagos temperados liberados de cepas lisógenas integrantes del fermento (Brussow y col., 1998; Nielsen, 1998).

Obtención de cepas modificadas con fagorresistencia mejorada

Diferentes estrategias pueden implementarse para obtener cepas con fagorresistencia aumentada, entre las cuales podemos citar:

Aislamiento de mutantes espontáneos fago-resistentes: El desarrollo de BIMs (*bacteriophage insensitive mutants*) fue la primera estrategia empleada para transformar cepas sensibles en derivados resistentes. Los BIMs son descendientes espontáneos fago – resistentes que sobreviven a la exposición a fagos líticos por períodos prolongados, muy probablemente y en la mayoría de los casos, debido a cambios en el receptor para la adsorción del fago (Boucher y Moineau, 2001). Los BIMs son generalmente resistentes a fagos específicos ya que probablemente surgen como consecuencia de mutaciones puntuales espontáneas en el cromosoma (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Se trata de una estrategia de evolución natural, y presenta una serie de ventajas:

- Es simple y rápida;
- No posee restricciones reglamentarias para su uso industrial, debido a que las variantes obtenidas son mutantes espontáneos y, al igual que las cepas sensibles de las que derivan, poseen status GRAS;
- Es una alternativa valiosa para géneros de bacterias lácticas en los cuales los demás métodos son difíciles de aplicar (Reinheimer, 2005).

Entre sus desventajas se incluyen: una restringida especificidad fágica, alta frecuencia de reversión del fenotipo de resistencia, y la posible pérdida o reducción de algunas propiedades metabólicas (por ej., reducida velocidad de crecimiento celular) (Moineau, 1999; Boucher y Moineau, 2001). Por otro lado, existen cepas, en especial de lactococos, a partir de las cuales no ha sido posible aislar BIMs (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Sin embargo, es una metodología valiosa para géneros de bacterias lácticas termófilas, particularmente muy empleadas en Argentina, en las cuales existe una relativa ausencia de plásmidos y dificultad para conjugarse o transformar plásmidos (Reinheimer, 2005). En particular, se obtuvieron variantes fago resistentes para *Lb. helveticus*, con excelente

desempeño en la producción de queso sardo (Quiberoni y col., 1999b), para *Lb. helveticus* CNRZ 328 con fenotipos de resistencia estables, no ligados a plásmidos y algunos de los cuales mostraron buena actividad proteolítica (Reinheimer y col., 1993), para *Lb. delbrueckii* (Guglielmotti y col., 2006a) y para *St. thermophilus* (Binetti y col., 2003), incluso presentando mayores velocidades de acidificación, actividades acidificantes y/o actividades proteolíticas que sus cepas de origen, con elevada fago resistencia y buena estabilidad de ese fenotipo.

Muchos BIMs han sido aislados y algunos están siendo empleados satisfactoriamente en la industria (Limsowtin y Terzaghy, 1976; Moineau y Lévesque, 2005).

Una nueva generación de BIMs puede desarrollarse empleando técnicas de ingeniería genética. Geller y col. dirigieron mutaciones para obtener derivados fagorresistentes de una cepa sensible de lactococo, pero sin afectar su velocidad de crecimiento (Boucher y Moineau, 2001).

Transferencia conjugativa de plásmidos de fagorresistencia: Los sistemas antifago codificados en plásmidos pueden ser introducidos en una cepa por conjugación y transformación por electroporación. La conjugación es un mecanismo natural de transferencia de genes, por lo que es ampliamente aceptado y puede ser utilizado en la industria para construir cepas resistentes a fagos. Incluso es posible combinar mecanismos complementarios de defensa fágica en una misma cepa. La estrategia PDRS, tal como se explicara anteriormente, plantea la rotación de cepas isogénicas generadas por la introducción de distintos sistemas de resistencia en la misma cepa original. Esta estrategia puede extender el plazo de uso sin inconvenientes de cepas particulares de bacterias lácticas (Reinheimer, 2005). La transformación por electroporación está limitada legalmente en muchos países (Moineau, 1999; Reinheimer, 2005).

Si bien se han logrado obtener cepas de uso industrial, esta metodología presenta algunos inconvenientes en cuanto a la existencia de muchas cepas refractarias a la adquisición de nuevo ADN, a la incompatibilidad y/o inestabilidad de plásmidos, al uso de marcadores de selección que limitan la aplicación industrial y al efecto, sobre el crecimiento celular y la producción de acidez, de adicionar múltiples plásmidos (Moineau, 1999).

Técnicas basadas en ADN recombinante: El creciente conocimiento acerca de los fagos de bacterias lácticas y la disponibilidad parcial o completa de secuencias de un número de genomas fágicos, han permitido el desarrollo de sistemas de resistencia fágica artificiales diseñados mediante técnicas de ingeniería genética. Éstos aportan nuevas armas para combatir a las infecciones fágicas, resultando (en general) altamente efectivas, pero muy específicas hacia los fagos para los cuales han sido diseñadas y para otros muy relacionados. Por otro lado, estas tecnologías no cuentan con la total aceptación por parte de las industrias y consumidores (Forde y Fitzgerald, 1999; McGrath y col., 2002) y las cepas modificadas por ingeniería genética no pueden todavía aplicarse en alimentos (Reinheimer, 2005). Adicionalmente, es importante destacar que muchas cepas industrialmente valiosas, son refractarias a la manipulación genética (Moineau y Lévesque, 2005).

Debido a que los fagos de lactococos son los más estudiados entre los fagos que atacan a las bacterias lácticas, estas técnicas han sido desarrolladas principalmente para este género. Entre ellas, podemos mencionar las siguientes:

- **Per (*Phage-encoded resistance*):** Durante la última década, algunos elementos genéticos de los fagos se han vuelto una fuente de atributos de resistencia. Un sistema de este tipo es el denominado **Per**, el cual involucra la presencia de orígenes de replicación (*ori*) de fagos contenidos en un plásmido de elevado número de copias en la célula bacteriana (Moineau y Lévesque, 2005). A continuación de la infección fágica, se observa un aumento en el número de copias del plásmido que contiene al *ori*. Estas estructuras de ADN interfieren con el ciclo lítico del fago, ofreciendo señales de replicación falsas que compiten por los factores de replicación, conduciendo a una disminución dramática en la replicación del ADN fágico. El nivel de resistencia fágica conferida es directamente proporcional al número de copias del plásmido. Adicionalmente, puede aumentarse la defensa, clonando múltiples copias del *ori* en un plásmido de alto número de copias. El fenotipo de este mecanismo se manifiesta como un **Abi**, mediante una reducción en la EOP y la disminución del tamaño de placas de lisis (McGrath y col., 2002). Desgraciadamente, es altamente específico, afectando exclusivamente fagos que poseen orígenes de replicación

homólogos al que se encuentra en el plásmido. Además, algunos fagos sensibles al sistema Per, evolucionaron adquiriendo nuevos ori, de profagos o fagos defectivos, para escapar de este mecanismo de resistencia (Boucher y Moineau, 2001). Se ha demostrado que la emergencia de fagos mutantes insensibles a Per puede ser prevenida por inactivación de ciertas secuencias específicas del cromosoma del huésped (McGrath y col., 2002).

En 1990 Hill y col. introdujeron por primera vez un fragmento de 1,4 kb que poseía el origen del fago $\phi 50$ en *Lc. lactis* subsp. *lactis* NCK203, incrementando la resistencia de esta cepa a este fago, y a otros con ori homólogos (ej. $\phi 48$), pero fallaba en resistir a fagos de distinto ori ($\phi 31$). Frente a $\phi 31$, se desarrolló otro sistema (Per31), y luego tanto Per50 como Per31 se emplearon exitosamente en un programa de estrategia de defensa fágica por rotación (PDRS) (Hill 1993; Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999).

Sistemas del tipo Per han sido construidos y caracterizados en *St. thermophilus* y *Lb. casei*, además de los ya descritos para *Lb. lactis* (Forde y Fitzgerald, 1999; Moscoso y Suárez, 2000; McGrath y col., 2002). Parecería que aquéllos dirigidos contra fagos de *St. thermophilus* son los de mayor aplicación debido a que estos fagos tendrían acceso a un grupo limitado de ori diferentes.

- **ARN antisentido (Antisense RNA):** El silenciamiento de genes mediante la tecnología de ARN antisentido es un medio alternativo para generar cepas fago resistentes y se ha visto rápidamente impulsada gracias a la emergencia de secuencias nucleotídicas completas de genomas fágicos y a la caracterización de genes individuales (Moineau y Lévesque, 2005).

La utilización de una estrategia antisentido involucra el clonado de un gen especialmente seleccionado en orientación reversa con relación a un promotor activo. El ARN antisentido resultante formaría híbridos doble cadena con al ARNm complementario, inhibiendo de esta forma la traducción, al no poder unirse adecuadamente al ribosoma y/o incrementando la sensibilidad frente a enzimas que

degradan ARN. El resultado es que no se logra la síntesis de la proteína, con posibles y deseables consecuencias de fago-resistencia por parte de la bacteria. El fenotipo característico corresponde al de un *Abi*, con EOP disminuidas y placas de lisis reducidas, indicando un efecto adicional sobre el *burst size* (Hill, 1993; Hill y Fitzgerald, 1996; McGrath y col., 2002).

Las estrategias antisentido han tenido un éxito relativo en función del gen seleccionado. Se han empleado genes que codifican para la proteína principal de la cápside, probables subunidades de ADN polimerasa, terminasa, proteína principal de la cola, probables factores de transcripción, entre otros. Debido a que son altamente conservados entre los bacteriofagos, los genes involucrados en las funciones de replicación del ADN, podrían ser los mejores blancos para esta tecnología (Moineau y Lévesque, 2005). El diseño debería ser efectivo si el gen elegido es crítico para el desarrollo del fago, conservado y expresado a niveles de transcripción bajos, de modo que sea factible la estrategia de ARN antisentido. También se observó que la eficiencia de inhibición depende de la cantidad producida de ARN antisentido. En general, a mayor relación ARN *antisense*/ARN *sense*, mayor es la inhibición (Klaenhamer y Fitzgerald, 1994; Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999; Boucher y Moineau, 2001).

De igual modo que el mecanismo *Per*, esta estrategia está diseñada en base a fagos específicos y no es una defensa generalizada (Hill y Fitzgerald, 1996).

La aplicación de esta tecnología para controlar la proliferación fágica ha sido empleada sólo para lactococos. Sin embargo, podría ser aplicada en teoría a otras especies comercialmente importantes de bacterias lácticas como *St. thermophilus* y lactobacilos. En realidad, el alto grado de conservación entre los módulos de replicación de los fagos de *St. thermophilus* parecería alentar la posibilidad de desarrollo de una estrategia de amplio rango.

De modo similar a *Per*, se ha reportado la emergencia de fagos insensibles a esta estrategia, por lo que lo más acertado sería su utilización en combinación con los

mecanismos naturales de fago-resistencia presentes en bacterias lácticas (McGrath y col., 2002).

- **Sistema suicida disparado por el fago (*Phage-triggered suicide system*):** Se trata de un mecanismo de defensa frente a fagos, diseñado por ingeniería genética, que imita las características fenotípicas de la infección abortiva. Ha sido desarrollado por Djordjevic y col. (1997) en *Lb. lactis*, clonando un *cassette* de restricción (sin su correspondiente metilasa) en un plásmido de elevado número de copias, a continuación de un promotor fago-inducible (Forde y Fitzgerald, 1999). Durante la infección fágica, se produce la activación del promotor fágico inducible que gatilla la expresión del gen letal bacteriano y conlleva a la eliminación simultánea del huésped y de los fagos infectivos (Djordjevic y col., 1997; Boucher y Moineau, 2001). Desafortunadamente, también se aislaron fagos mutantes insensibles a este mecanismo, en los cuales se observó una alteración en el reconocimiento del promotor y una habilidad disminuida para producir su inducción (McGrath y col., 2002).

El uso extensivo de cepas con resistencia mejorada frente a fagos, conduce a la aparición de fagos mutantes capaces de sortear los sistemas antifago (Boucher y Moineau, 2001). La combinación de varios sistemas de resistencia frente a fagos ha probado ser de extrema utilidad a nivel industrial. Pero aún cuando la incidencia de las infecciones fágicas en las industrias se reduce, el problema no desaparece. En realidad, los fagos eluden los mecanismos de defensa bacterianos por modificaciones e intercambios genéticos diversos (recombinaciones homólogas o sitio específicas con el cromosoma bacteriano o entre fagos, mutaciones puntuales o pequeñas inserciones y deleciones) que les permiten adquirir nuevas características de evasión (Moineau y col., 2002).

III BACTERIOFAGOS DE *Lactobacillus casei/paracasei*

III.1 Fagos aislados hasta el momento

En los últimos 70 años, se han aislado y caracterizado fagos para todas las especies industrialmente importantes de bacterias lácticas: lactococos (Jarvis, 1989; Moineau y col., 1994; Dinsmore y Klaenhammer, 1995; Suárez y Reinheimer, 2002); *Lactobacillus helveticus* (Accolas y Spillman, 1979; Neviani y col., 1992; Séchaud y col., 1992; Reinheimer y col., 1993); *Lb. delbrueckii* (Cluzel y col., 1987; Chow y col., 1988; Auad y col., 1997; Alatossava y col., 1998; Quiberoni y col., 2004) y *St. thermophilus* (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Brussow y col., 1998; Quiberoni y col., 2003b; Binetti y col., 2005). Debido al uso intensivo de los cultivos de lactococos, sus fagos han sido más extensamente estudiados (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). En los últimos años, los cultivos termófilos se han aplicado más extensivamente en la industria, por lo que se están incrementando los problemas por fagos de *St. thermophilus* (Moineau, 1999).

Con relación a cultivos potencialmente probióticos, se ha reportado la existencia de fagos líticos y/o temperados para las especies *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, y *Lb. gasseri*. Hasta el momento no existen registros bibliográficos de aislamientos de fagos que ataquen cepas del género *Bifidobacterium*, ni para *Lb. acidophilus*. Los fagos de bacterias probióticas se encuentran en gran desventaja, tanto en número como en el conocimiento que existe acerca de ellos, en comparación con los fagos de bacterias lácticas acidificantes.

El bacteriofago B2 (lítico para *Lb. plantarum* ATCC 8014) es el primer fago específico de esta especie investigado en detalle. Fue aislado en 1971 y se encuentra depositado en la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Nes y col., 1988). Fagos de *Lb. plantarum* han sido aislados de diferentes alimentos fermentados: el fago fri, a partir de un fermento cárnico comercial, ϕ LP-1 aislado de ensilado de maíz, ϕ LP-2 aislado de un suero de queso artesanal y los fagos líticos ϕ JL-1 (Lu y col., 2003) y ϕ SC921 (Yoon y col., 2001), aislados a partir de fermentaciones de vegetales. La secuencia genómica completa del ϕ JL-1 ha sido recientemente determinada (Lu y col., 2005).

Varios fagos específicos de *Lb. fermentum* fueron aislados de muestras de panes elaborados con harina de trigo: tres fagos líticos (FE5-B1, Z63-B1 y BU77-B1) aislados de masa panaria ácida empleada en la manufactura de panes regionales y un fago temperado (OF3), inducido de una cepa de *Lb. fermentum* (DISTAM FE3) aislada de una muestra de harina de trigo (Foschino y col., 1995; 1996).

La cepa *Lb. gasseri* ADH (originalmente *Lb. acidophilus* ADH) es lisogénica y contiene al profago ϕ_{adh} en su cromosoma. El profago ϕ_{adh} puede ser inducido por tratamientos con mitomicina C y con luz UV. Fue caracterizado y se demostró que exhibe ciclos de replicación líticos y lisogénicos clásicos sobre la cepa ADH (Raya y col., 1989). La región de ADN codificante para las funciones de integración del fago al cromosoma bacteriano fue secuenciada (Fremaux y col., 1993).

El primer fago específico para *Lb. casei*, J-1, fue aislado en 1965 como agente responsable de fallas en la fermentación durante la manufactura de Yakult (Séchaud y col., 1988). Dos años más tarde, bajo idénticas circunstancias, se aisló el fago PL-1. Ambos fagos se encuentran serológicamente relacionados, siendo probablemente el fago PL-1, un mutante derivado del fago J-1 (Watanabe y col., 1970). J-1 y PL-1, especialmente este último, han sido muy investigados por distintos grupos en Japón y fueron depositados junto con sus cepas sensibles (ATCC 27139 y ATCC 27092, respectivamente) en la ATCC (Yokokura, 1971; Watanabe y Takesue, 1972; Ishibashi y col., 1982; Nakashima y col., 1994).

La cepa de *Lb. casei* ATCC 27139, empleada para la preparación de bebidas lácteas fermentadas, frecuentemente era atacada por fagos. Un número de fagos virulentos, serológicamente idénticos, se aislaron de distintas industrias japonesas y se agruparon bajo el nombre de ϕ_{FSV} (Séchaud y col., 1988). Posteriormente, se demostró que la cepa era lisógena, aunque el profago ϕ_{FSW} no podía ser inducido por técnicas convencionales. Su existencia se demostró por aislamiento de un derivado termosensible obtenido por mutagénesis química (Shimizu-Kadota y Sakurai, 1982). Los fagos ϕ_{FSV} -A, -B y -C serían fagos virulentos cuyo origen fue el fago temperado ϕ_{FSW} (Davidson y col., 1990; Neve, 1996). Un análisis detallado de los fagos líticos y el temperado reveló que eran idénticos

excepto que, ϕ FSV-A es derivado del ϕ FSW originado por varias mutaciones puntuales, mientras que los otros dos, habían adquirido un nuevo fragmento de ADN de 1,3 kb (Shimizu-Kadota y col., 1983; Shimizu-Kadota y Tsuchida, 1984). El análisis de la secuencia indicó que este era un elemento de inserción (ISL), el primero aislado en bacterias Gram + (Shimizu-Kadota y col., 1988), y que media la transición del ciclo de crecimiento del fago, de lisogénico a lítico (Shimizu-Kadota y col., 1985; 2000).

El fago virulento LC-Nu fue aislado de una muestra de suero de quesería en Finlandia. Se propaga sobre la cepa de *Lb. casei* 1/3, la cual se empleaba como componente de un *starter* mixto para la elaboración de queso Emmental (Forsman y col., 1993). Si bien actualmente la cepa se conoce como *Lb. rhamnosus* Lc 1/3, el genoma fágico ha sido completamente secuenciado y se encontró que aparentemente tendría un origen evolutivo temperado compartiendo homología en el ADN con los fagos temperados de *Lb. casei* ϕ AT3 y ϕ 393/A2 y también con PL-1 y ϕ FSW (Tuohimaa y col., 2006).

El fago ϕ 393-A2 también se aisló de una muestra de suero de quesería, de la manufactura de un queso azul artesanal de larga maduración elaborado sin la adición de *starters* externos (Herrero y col., 1994). Es un fago temperado capaz de integrarse al cromosoma bacteriano y generar lisógenos estables. Ha sido extensamente estudiado (Ladero y col., 1998; Alvarez y col., 1999; García y col., 1999; Moscoso y suárez, 2000) y se propaga sobre la cepa de *Lb. casei* ATCC 393.

Esta cepa de colección alberga en su cromosoma al profago ϕ AT3 cuya secuencia genómica fue reportada recientemente (Lo y col., 2005).

La cepa de colección ATCC 27092, sensible a PL-1, también es lisógena. La escisión del profago se produjo por tratamiento con mitomicina C de células en fase exponencial de crecimiento, y el fago temperado PL-2 fue detectado por microscopía electrónica (Nakashima y col., 1998).

Se sabe que el fenómeno de lisogenia es frecuente en *Lactobacillus*, y que los fagos de *Lb. casei* suelen presentar un comportamiento dual: temperados y virulentos. Incluso el fago

PL-1 (lítico para ATCC 27092) es capaz de lisogenizar a *Lb. casei* ATCC 334 (Davidson y col., 1990; Séchaud y col., 1988).

III.2 Importancia industrial de la infección fágica en bacterias probióticas

El ataque por fagos a las bacterias integrantes de los cultivos iniciadores representa una de las principales causas de problemas de acidificación en la industria láctea mundial, ocasionando serias dificultades tecnológicas y grandes pérdidas económicas (Jarvis, 1989; Brussow y col., 1994; Bruttin y col., 1997).

Las infecciones fágicas en bacterias probióticas son particularmente serias por las características relacionadas con estas bacterias y su aplicación industrial. Los cultivos probióticos comercialmente disponibles consisten en una única cepa en preparaciones altamente concentradas para aplicación directa a la tina. El uso de estos cultivos DVS, ya sea congelados o liofilizados, es muy común debido a las dificultades, previamente mencionadas, involucradas en la propagación de los probióticos. En muchos casos estos cultivos se emplean como “aditivos” en alimentos, sin que exista una propagación de las células, con el objeto de contribuir a las propiedades probióticas funcionales específicas del producto. En otros casos, estos cultivos se utilizan para producir alimentos probióticos fermentados (Saarela y col., 2000).

Con relación a las infecciones fágicas, se derivan una serie de consideraciones importantes. En principio, el ataque fágico sobre bacterias probióticas sólo tendrá lugar si estos cultivos se emplean para la obtención de alimentos fermentados, ya que para poder multiplicarse los fagos necesitan de células en activa propagación (Neve y Teuber, 1991). Las bacterias probióticas no son frecuentemente muy adecuadas como microorganismos iniciadores en una fermentación. Sin embargo, en muchos casos el modo de producción de las cepas puede afectar sus propiedades probióticas. Además, cuando el probiótico crece durante la fermentación, se incrementa la concentración celular logrando disminuir los costos del proceso e incrementar la adaptación de los probióticos al alimento (Saarela y col.,

2000). Por lo tanto, a pesar de que su crecimiento es lento, se utilizan como *starters* en fermentaciones que pueden incluso durar varios días. Eso los convierte en un blanco muy vulnerable frente a bacteriofagos y brinda un tiempo prolongado que favorece el alcance de títulos fágicos muy elevados.

En casos en que el cultivo es monocepa, un ataque fágico severo conduce a la pérdida de la producción, pero no menos grave es la consecuencia si se trata de cultivos mixtos. Aún cuando alguna de las cepas del cultivo permanezca activa y viable, el conjunto de características probióticas no estará debidamente presente en el producto.

Finalmente, las pérdidas económicas asociadas a infecciones fágicas sobre bacterias probióticas son infinitamente mayores que sobre bacterias lácticas. Esto es debido a los grandes costos implicados en la adición de cultivos probióticos a los productos lácteos, por las características probióticas particulares únicas de una cepa, y por los costos en dinero y tiempo dispensados en investigación y desarrollo para avalar seriamente el empleo de un cultivo probiótico en un producto determinado.

Recientemente, el interés en la biología de fagos que infectan bacterias probióticas se ha ido incrementando, como resultado de la diversificación e intensificación en el uso de estos grupos bacterianos en la industria láctea fermentativa mundial (Moscoso y Suárez, 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar conocimientos científicos sobre la interacción de *Lactobacillus casei* / *paracasei* con fagos específicos.

Objetivos particulares:

- Releva la difusión de la sensibilidad fágica en cepas de diferentes orígenes.
- Aislar fagos autóctonos específicos de la especie.
- Caracterizar fagos específicos de la especie.
- Obtener y caracterizar mutantes espontáneos fago resistentes a partir de cepas sensibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

II MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Cepas

Cepas de *Lactobacillus casei* / *paracasei* de distintos orígenes fueron empleadas para realizar este trabajo. Las cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 y *Lb. casei* subsp. *casei* ATCC 27139, provienen de la colección ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, Virginia, USA) y la cepa Tipo de *Lb. casei* ATCC 393 fue gentilmente cedida por la Dra. Sandra Ruzal (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina). La cepa *Lb. paracasei* A fue aislada a partir de un fermento comercial congelado empleado industrialmente para la obtención de una leche fermentada probiótica y pertenece a la colección del INLAIN.

Para los estudios de determinación del espectro de huéspedes se emplearon cepas adicionales: 16 cepas de *Lb. paracasei* (5 cepas de colección, 10 cepas comerciales y una cepa aislada de heces de infante), 13 cepas de *Lb. casei* (5 cepas de colección, 1 cepa comercial y 7 cepas “NSLAB”, aisladas de quesos), 16 cepas de *Lb. rhamnosus* (3 cepas comerciales, 9 cepas aisladas de heces de infantes y 4 cepas “NSLAB”) y 2 cepas de *Lb. gasseri* (aisladas a partir de heces de infantes) (Tabla 4). Todas estas cepas están integradas a la colección del INLAIN.

Tabla 4. Cepas de lactobacilos empleadas en la determinación del espectro de huéspedes de los fagos de colección PL-1 y J-1; autóctonos MLC-A, MLC-A2, MLC-A6 y MLC-A7R y fago ϕ 393/A2.

Microorganismo	Cepa	Origen ¹	Microorganismo	Cepa	Origen ¹
<i>Lactobacillus paracasei</i>	ATCC 27092	ATCC	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG	Cepa comercial
	Yk	Cepa comercial		A15	Cepa comercial
	Hn	Cepa comercial		A16	Cepa comercial
	Dn	Cepa comercial		F22	Colección INLAIN
	A	Cepa comercial		F30	Colección INLAIN
	A13	Cepa comercial		F49	Colección INLAIN
	A14	Cepa comercial		F53	Colección INLAIN
	Bio	Cepa comercial		F56	Colección INLAIN
	L26	Cepa comercial		F70	Colección INLAIN
	SA	Cepa comercial		F74	Colección INLAIN
	PR	Cepa comercial		F85	Colección INLAIN
	CNRZ 1224	CNRZ		F95	Colección INLAIN
	CNRZ 1308	CNRZ		73	Colección INLAIN
	CNRZ 318	CNRZ		75	Colección INLAIN
CNRZ 1976	CNRZ	77	Colección INLAIN		
JP1	Colección INLAIN	78	Colección INLAIN		
<i>Lactobacillus gasseri</i>	F37	Colección INLAIN			
	F37"	Colección INLAIN			
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 27139	ATCC			
	ATCC 393	ATCC			
	CNRZ 1874	CNRZ			
	72	Colección INLAIN			
	81	Colección INLAIN			
	84	Colección INLAIN			
	85	Colección INLAIN			
	86	Colección INLAIN			
	88	Colección INLAIN			
	90	Colección INLAIN			
	8	Colección INLAIN			
M	Colección INLAIN				
SA	Cepa comercial				

¹ ATCC, Manassas, USA; colección CNRZ, Jouy en Josas, Domaine de Vilvert, France; colección INLAIN, Santa Fe, Argentina.

Conservación y reactivación de las cepas

Las cepas fueron conservadas por congelamiento a -20 y -80°C , utilizando caldo MRS suplementado con glicerol (15% v/v), como crioprotector. Para esto, las cepas fueron desarrolladas previamente durante 16-18 hs en caldo MRS a 37°C . Estos cultivos fueron adicionados al 20% a la solución crioprotectora, repartidos en alícuotas de 1 ml en crioviales estériles, y luego congelados a -20 y a -80°C .

Las cepas conservadas por congelamiento fueron reactivadas en caldo MRS a 37°C (24 – 48 hs), luego reinoculadas en caldo para ser empleadas en los distintos ensayos e incubadas a 37°C durante 16-18 hs.

II.2 Bacteriofagos

En el desarrollo de este trabajo, se emplearon fagos provenientes de diversos orígenes:

- Fagos líticos de la colección ATCC, identificados como ATCC 27092-B1 ó PL-1 y ATCC 27139-B1 ó J-1, cuyas cepas sensibles son *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 y *Lb. casei* subsp. *casei* ATCC 27139, respectivamente. Ambos fagos fueron aislados de accidentes ocurridos durante la fermentación de Yakult en plantas industriales japonesas (Watanabe y col., 1970; Séchaud y col., 1988), y depositados en la colección ATCC.
- Para ciertos estudios particulares se empleó el fago temperado $\phi 393/A2$, que se comporta como virulento sobre la cepa de *Lb. casei* ATCC 393, y que fue gentilmente provisto por la Dra. Sandra Ruzal (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina). Este fago fue aislado por un grupo de investigadores españoles (Herrero y col., 1994), a partir del suero de elaboración de un queso artesanal.
- Asimismo, se emplearon fagos líticos específicos de *Lb. casei* / *paracasei* aislados en el INLAIN entre 2003 y 2006. Los mismos se identificaron como: MLC-A, MLC-A2, MLC-A3, MLC-A3R, MLC-A4, MLC-A4R, MLC-A5, MLC-A6, MLC-A9, MLC-

A10, MLC-A11, MLC-A12R y pMLC-A. Todos estos fagos se encuentran depositados en la Colección de Bacteriofagos del INLAIN y el fago MLC-A, en particular, se halla además depositado en el Centro de Referencia para Bacteriofagos Félix d'Hérelle (Québec, Canadá) (www.phage.ulaval.ca).

Sólo el fago MLC-A fue caracterizado en detalle, mientras que los restantes fueron empleados para algunas experiencias particulares.

Esta serie de fagos fue aislada de muestras provenientes de fermentaciones anormales de una leche fermentada probiótica manufacturada por una empresa láctea argentina.

II.3 Metodología general empleada para el estudio de fagos de *Lactobacillus casei* / *paracasei*

II.3.1 Conservación de los fagos

Se trabajó con un *stock* de filtrado de alto título, que se conservó en heladera (4°C). También se dispuso de una reserva almacenada a -20 y a -80°C, de las suspensiones fágicas adicionadas de glicerol (15% v/v).

II.3.2 Propagación de los fagos

Los fagos utilizados fueron propagados sobre sus correspondientes cepas sensibles empleando caldo MRS suplementado con CaCl₂ 10 mM (MRS-Ca) (Neviani y col., 1992). Un cultivo obtenido por incubación durante 16-18hs de la cepa fue inoculado en caldo MRS-Ca fresco y adicionado del fago correspondiente a diferentes dosis infectivas (*m.o.i.*, *multiplicity of infection* = concentración de partículas virales / concentración de células bacterianas), variables entre 10⁻² y 10⁻³ aproximadamente. Asimismo, se inoculó un tubo con el cultivo sin infectar (control), para monitorear el crecimiento normal de la cepa. Los tubos fueron homogeneizados en forma suave y periódica y examinados durante la incubación a 37°C por aproximadamente 5-7 hs. El *m.o.i.* elegido fue aquél para el cual la lisis completa se manifestó en forma más tardía, garantizando una máxima propagación de las partículas

fágicas. El lisado resultante se prefiltró (prefiltro MILLIPORE AP25) y luego se filtró (membranas MILLIPORE, diámetro de poro 0,45 μm), a fin de eliminar los detritus celulares. Estas suspensiones de fagos se titularon a fin de confirmar una alta ($> 10^6$ ufp/ml) concentración de partículas infectivas y se almacenaron a 4, -20 y -80°C.

II.3.3 Titulación de fagos

La concentración de partículas fágicas (título) presente en los lisados obtenidos luego de las propagaciones, así como en todas las experiencias donde se cuantifiquen los viriones, se determinó por el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christianson, 1991). De acuerdo a ésta, en cajas de Petri divididas en cuartos y estériles, se depositaron 2 ml de agar MRS con Ca 10 mM y glicina 100 mM (MRS-Ca-Gli) en cada cuadrante (Lillehaug, 1997) y se dejó solidificar. Por otro lado, se prepararon diluciones decimales de las suspensiones fágicas a testear, en caldo MRS. Se colocaron 100 μl de dichas diluciones en tubos de hemólisis conteniendo 100 μl de suspensión celular de la cepa sensible (0,2 – 0,5 ml de un cultivo desarrollado por 16-18 hs en 5 ml de caldo MRS fresco) y finalmente se agregó 1 ml de MRS *soft agar* (caldo MRS adicionado de agar bacteriológico al 0,6% m/v). Inmediatamente, se volcó el contenido de los tubos de hemólisis en cada cuadrante de las placas con MRS agarizado, correspondiendo a las distintas diluciones efectuadas. Se dejó solidificar y se incubó en microaerofilia a 34°C durante 16-18 hs.

Luego de la incubación se realizó el recuento de las placas de lisis y la determinación del título correspondiente (ufp/ml: unidades formadoras de placa por ml), calculado de la siguiente manera:

$$\text{Título (ufp/ml)} = n^{\circ} \text{ de placas de lisis} \times \text{dil}^{-1} \times 10$$

II.4 Aislamiento de los bacteriofagos autóctonos de *Lactobacillus paracasei* (MLC-Ai)

II.4.1 Muestras

Por un lado, se recibieron envases conteniendo al cultivo concentrado congelado empleado como fermento. Éste estaba compuesto por un cultivo monocepa de *Lb. paracasei* (identificada por nosotros como cepa A) y para su reactivación, se inoculó una ansada en caldo MRS fresco y se incubó a 37°C durante 16-18 hs. Posteriormente, se realizaron estrías del cultivo desarrollado en placas de MRS agarizado y se incubaron a 37°C por 48 hs. Se verificó la pureza del cultivo por observación macroscópica de la morfología de las colonias y por observación directa de su morfología celular al microscopio óptico (Microscopio Trinocular Jenamed 2, Carl Zeiss-Jena), a partir de preparados en gota fresca, con inmersión, contraste de fases y aumento de 1000x.

Por otro lado, se recibieron para ser analizadas, muestras obtenidas en diferentes momentos del proceso industrial así como de diferentes sitios o ambientes de la planta (gabinetes de aire estéril, aire de sala de siembra, aire de sala de elaboración, hielo de *freezers*, hisopados de los envases que contienen al fermento).

II.4.2 Tratamiento de las muestras. Búsqueda de fagos

Las muestras se observaron microscópicamente (contraste de fases, 1000x) y se les determinó el pH (Peachímetro Orion S 720). A continuación se procesaron siguiendo, en líneas generales, las indicaciones de IDF (*International Dairy Federation*) (Neve y Teuber, 1991). A aquellas muestras con pH superior a 4,6 se les adicionó ácido láctico de modo de ajustar el pH por debajo de ese valor (con el objeto de precipitar las caseínas), con excepción de las muestras de fermento que se procesaron sin ajuste de pH. Seguidamente, todas las muestras fueron centrifugadas (10.000 g, 15 min), prefiltradas (prefiltro MILLIPORE AP25) y filtradas (membranas MILLIPORE, diámetro de poro de 0,45 µm).

Con el objetivo de diferenciar la presencia de bacteriofagos de otros agentes inhibidores, una alícuota de cada filtrado se trató a 90°C por 15 minutos. Este tratamiento inactiva a la mayoría de los bacteriofagos, sin afectar a los demás inhibidores (por ej., antibióticos). Los filtrados, tanto calentados como no, fueron empleados en los Test de Turbidez y Spot Test, para investigar la presencia de bacteriofagos.

II.4.3 Test de Turbidez

Se inocularon 0,2 ml de un cultivo incubado durante 16-18 hs de la cepa de *Lb. paracasei* A en 5 ml de caldo MRS-Ca. Se agregaron 0,5 ml de los filtrados de las muestras, tal cual y tratadas térmicamente, y se incubaron en estufa a 37°C. Paralelamente, se incubó un tubo control sin agregado de muestra para monitorear el desarrollo normal del cultivo. El seguimiento visual del aumento de turbidez se realizó por comparación del tubo control con los tubos conteniendo muestra, y por un período de tiempo tal que permita un buen desarrollo del cultivo control.

Si no se produjo la lisis de los cultivos adicionados con las muestras sospechadas de contener fagos, se realizaron dos repiques en días sucesivos, partiendo de los tubos correspondientes del día anterior y se continuó con el monitoreo visual.

Con esta metodología es posible distinguir la naturaleza del agente inhibidor, ya que si en el filtrado existe una inhibición del tipo química, su efecto sería decreciente en los sucesivos repiques por dilución de la sustancia, y resultaría en un crecimiento celular cuando la concentración del inhibidor disminuye lo suficiente. Por el contrario, si se trata de un fago, con los sucesivos repiques se logra la propagación del mismo y se produce la lisis del cultivo.

II.4.4 Spot Test

En un cuadrante de Cajas de Petri estériles conteniendo una base de agar MRS-Ca-Gli se agregó una mezcla de 0,1 ml de una suspensión celular de *Lb. paracasei* A (0,3 ml de un cultivo desarrollado por 16-18 hs en 5 ml de caldo MRS fresco) y 1 ml de MRS *soft agar*. Se dejaron secar las placas así preparadas durante 30 minutos (en gabinete de flujo laminar

horizontal CASIBA) y luego se agregó una gota (50 μ l) de los filtrados de las muestras, tal cual y calentados. Una vez que las gotas fueron absorbidas, las placas se incubaron en microaerofilia a 34°C durante 16-18 hs.

Durante la incubación, el cultivo desarrolla dando origen a la formación de un césped denso, y en caso de existir fagos o sustancias inhibidoras en los filtrados, aparece una zona de inhibición o lisis en el sitio donde se depositó la gota.

II.4.5 Aislamiento y purificación de los fagos

Se realizó la titulación de partículas fágicas en muestras positivas para la presencia de fagos, mediante aplicación del método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991). Luego de realizado el recuento, se cortó la porción de *soft agar* que contenía una placa de lisis perfectamente aislada, y se la colocó en 5 ml de caldo MRS fresco. Se dejaron difundir las partículas fágicas durante una noche a 4°C. Se adicionó CaCl₂ (10 mM) y 0,2 ml de un cultivo de la cepa obtenido por incubación en caldo durante 16-18 hs. Se incubó a 37°C hasta lisis completa. Luego, este lisado fue titulado y nuevamente se realizó el procedimiento indicado antes, a fin de asegurar la purificación de los fagos. Seguidamente, una alícuota del lisado se empleó en la propagación del fago purificado para obtener una suspensión de alto título. Finalmente, se filtró por membranas MILLIPORE y se almacenó como *stock* de fago a 4°C, para ser empleado en los distintos ensayos de caracterización. Además, se conservaron alícuotas de los fagos purificados, tal como se indicara anteriormente (-20 y -80°C).

II.5 Caracterización de los bacteriofagos

II.5.1.1 Microscopía electrónica

Las micrografías de los fagos de colección se realizaron en la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias (INTA - Castelar). Para ello, se partió de suspensiones fágicas altamente concentradas por

centrifugación y posteriormente sometidas a tinción con acetato de uranilo (UA, 2% m/v, pH= 4,5) o ácido fosfotúngstico (PTA, 2% m/v) (Bolondi y col., 1995).

Las micrografías del fago MLC-A se realizaron en el Département de Biologie Medycale, Faculté de Médecine, Université Laval (Quebec City, Canada). Sus partículas fágicas fueron sedimentadas en una ultracentrífuga J2-21 (Beckman, Palo Alto, California, USA) empleando un rotor JA-18.1 (60 minutos a 25.000 g) y lavadas dos veces con acetato de amonio (0,1 M, pH= 7) (60 minutos a 25.000 g). Los fagos purificados fueron coloreados con fosfotungstato de potasio (2% m/v, pH= 7,2) o acetato de uranilo (2% m/v, pH= 4,5) y examinados en un microscopio electrónico EM 300 (Philips, Eindhoven, The Netherlands) operado a 60 kV. La calibración se realizó empleando colas de fago T4 (113 nm en longitud) (Ackermann, 2004).

II.5.1.2 Análisis de restricción de los genomas fágicos

El estudio molecular de los fagos PL-1, J-1, ϕ 393/A2 y MLC-A se realizó en el Département de Biochimie et de Microbiologie, Faculté des Sciences et de Genie, Université Laval, Québec, Canadá.

El ADN de los fagos fue obtenido según la metodología reportada por Moineau y col. (1994). Los ADN purificados fueron digeridos con *EcoRI* y *HindIII* según las recomendaciones efectuadas por los proveedores (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Luego de la restricción, las muestras de ADN fueron calentadas a 75°C por 10 min para evitar que, de existir extremos cohesivos, éstos puedan unirse. Los fragmentos de la digestión del ADN fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8 % p/v), empleando como buffer de corrida Tris-acetato-EDTA (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA). Posteriormente, se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio y la visualización se llevó a cabo por fotografía sobre lámpara UV.

El tamaño de los genomas fue estimado por adición de los fragmentos obtenidos de la digestión con *HindIII*. Los patrones de restricción para todos los fagos fueron comparados entre sí.

II.5.1.3 Estudio de la diversidad genética para los fagos aislados en Argentina

Con el objeto de estudiar preliminarmente la diversidad existente entre algunos de los fagos aislados en nuestro país, originarios de una planta industrial de elaboración de leche fermentada probiótica, se analizaron los perfiles de restricción de los fagos MLC-A, MLC-A2, MLC-A3, MLC-A3R, MLC-A4, MLC-A4R, MLC-A5, MLC-A6, MLC-A9, MLC-A10, MLC-A11, MLC-A12R y pMLC-A.

La obtención del ADN de los fagos y los perfiles de restricción, se realizaron tal como se detallara en la sección precedente.

II.5.1.4 Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación

Se realizó un seguimiento de la viabilidad de las suspensiones fágicas de PL-1, J-1 y MLC-A a lo largo de su conservación a 4, -20 y -80°C. Para las dos últimas temperaturas, el caldo MRS de las suspensiones fágicas fue adicionado de glicerol al 15% v/v (concentración final).

A intervalos de tiempo preestablecidos se tomaron alícuotas y los títulos fágicos se determinaron por el método de la doble capa agarizada. Los resultados se expresaron como porcentajes de las concentraciones virales iniciales.

Para los fagos PL-1 y J-1 la viabilidad se estudió por un período de 18 meses, mientras que para el fago MLC-A el seguimiento se realizó durante 19 meses.

Además y para muestras enviadas por la industria, se monitoreó la viabilidad de los fagos presentes en los sobrenadantes de tales muestras procesadas, calentadas o no, realizando recuentos por el método de la doble capa agarizada, para tiempo inicial y a los 10 días. Durante ese período de tiempo, las muestras fueron conservadas en la heladera.

II.5.15 Viabilidad a distintos valores de pH

Se estudió el efecto del pH del medio sobre la viabilidad de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A. Para realizar este ensayo, distintas porciones de caldo MRS se ajustaron (en esterilidad) a valores de pH entre 2 y 11. Alícuotas de una suspensión fágica *stock* se adicionaron a los caldos con distintos pH (título final aproximado: 10^6 ufp/ml) y se dejaron en contacto por 30 minutos a 25°C y a 37°C. En paralelo se incubó un control donde el pH original del caldo no fue modificado (pH 6,5 +/- 0,2). Cumplido el tiempo estipulado, inmediatamente se procedió a titular las partículas fágicas viables por el método de la doble capa agarizada. Los resultados se expresaron como porcentajes de los recuentos fágicos iniciales.

II.5.16 Influencia de sacarosa y sales inorgánicas sobre la viabilidad de los fagos

Se estudió el efecto de estos solutos sobre la viabilidad de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A.

Para realizar este ensayo se prepararon soluciones de sacarosa (10% m/v), NaCl y KCl (1 y 2% m/v) en caldo MRS y en buffer TMG (Tris-ClH 10 mM, pH7,4; MgSO₄ 10 mM y gelatina 0,1% m/v).

Suspensiones fágicas (aprox. 10^6 ufp/ml) en las distintas soluciones a ensayar se incubaron por 4 horas a 37°C así como también en MRS y TMG sin el agregado adicional de solutos, a modo de controles. Finalizada la incubación, se determinaron los fagos viables por el método de la doble capa y los resultados se expresaron como porcentajes del título inicial.

II.5.17 Resistencia térmica y química de los fagos

Cinéticas de muerte térmica

Se llevaron a cabo estudios de inactivación térmica de los fagos, en tres medios de suspensión diferentes: caldo MRS, leche descremada reconstituida (LDR, leche descremada en polvo, al 10% m/v) y buffer TMG. Las temperaturas elegidas para los ensayos correspondieron a las

utilizadas normalmente en la industria para el tratamiento de la leche cruda en distintos procesos (63, 72 y 90°C). Los controles fueron mantenidos a temperatura ambiente (25°C). Las suspensiones de las partículas fágicas en estudio se inocularon en cada uno de los medios seleccionados (MRS, LDR y TMG) de manera de obtener una concentración inicial de aproximadamente 10^6 ufp/ml; luego, se distribuyeron en tubos *Eppendorf* (alícuotas de 1 ml) que fueron mantenidos a las temperaturas preestablecidas en baños de agua termostatizados. A intervalos de tiempo predeterminados (2, 5, 15, 30 y 45 min), los tubos fueron retirados del baño e inmediatamente refrigerados (baño de hielo), para luego determinar la concentración de partículas fágicas viables. Estos resultados fueron graficados en función del tiempo, para construir curvas de inactivación térmica a cada una de las temperaturas ensayadas, en los tres medios de suspensión elegidos. A partir de dichas curvas de supervivencia, para cada condición se determinó el tiempo necesario para inactivar al 99% de las partículas fágicas (T_{99}).

A partir de algunas muestras de leche fermentada provenientes de la industria, procesadas y calentadas a 90°C durante 15 min, tal como se explicara anteriormente, fue posible aislar fagos termorresistentes. El objetivo de las experiencias que a continuación se detallan fue estudiar, en forma preliminar, la resistencia térmica de algunos de estos fagos y el efecto de la concentración de partículas fágicas y el medio en el cual las mismas se encuentran contenidas.

Para ello, se seleccionaron dos fagos (MLC-A3R y MLC-A12R) termorresistentes, que fueron purificados y resuspendidos en MRS. Para MLC-A3R, se practicó un calentamiento a 90°C a una suspensión fágica de título inicial elevado (10^8 ufp/ml), en caldo MRS y se determinó el número de partículas viables a los 2 y 15 min por recuento en medio agarizado (método de la doble capa). El mismo ensayo se realizó con el fago MLC-A y se compararon los resultados obtenidos.

Para el segundo fago, se emplearon dos concentraciones fágicas iniciales (10^6 y 10^8 ufp/ml) y dos medios de suspensión. Se empleó LDR (pH = 6,17) y el medio empleado para la propagación del lactobacilo en la industria (medio de las muestras de Tanque de

Fermentación que provienen de la industria, pH = 3,8), pero luego de una corrección de pH (pH final = 6,57). Se determinó el número de partículas viables iniciales y luego de 15 min a 90°C, por el método de la doble capa agarizada.

Cinéticas de muerte química

Los biocidas fueron elegidos entre aquéllos utilizados frecuentemente para desinfección del material de laboratorio y/o equipamiento industrial: alcohol etílico (10, 50, 75 y 100% v/v), alcohol isopropílico (10, 50 y 100% v/v), hipoclorito de sodio comercial (desde 200 hasta 800 ppm de cloro activo), y ácido peracético (0,15% v/v). Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (25°C), con excepción del ácido peracético, que se ensayó a 40°C (Schröder, 1984).

Ambos alcoholes fueron diluidos en caldo MRS hasta la concentración deseada, mientras que las suspensiones de hipoclorito de sodio se realizaron en buffer fosfato (0,1 M, pH 7), y las de ácido peracético, en agua destilada estéril (pH resultante 3,0).

Se inocularon las partículas fágicas (concentración inicial de 10^6 ufp/ml, aprox.) e incubaron a las temperaturas fijadas de acuerdo a cada agente químico. A intervalos de tiempo preseleccionados, se tomaron alícuotas de las diluciones (100 μ l), titulándolas de inmediato, para determinar la concentración de fagos viables.

II.5.2 Interacción de *Lactobacillus casei* / *paracasei* con sus fagos específicos

II.5.2.1 Influencia de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} en el ciclo lítico de los fagos

Para estos ensayos se estudiaron los fagos de colección PL-1 y J-1, y el fago autóctono MLC-A sobre sus cepas sensibles de *Lb. paracasei* ATCC 27092, *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. paracasei* A, respectivamente.

La influencia del calcio en el ciclo de los fagos de colección para medio líquido y agarizado, también se evaluó para las cepas *Lb. paracasei* A, *Lb. paracasei* Yk, *Lb. paracasei* Hn, *Lb. paracasei* Dn, *Lb. paracasei* A13 y *Lb. paracasei* A14. Para el fago ϕ 393/A2, sólo se evaluó la influencia del calcio en la lisis en medio líquido.

Lisis en medio líquido

La influencia de estos cationes sobre la lisis celular se evaluó incubando cultivos infectados de *Lb. casei* / *paracasei* con sus fagos correspondientes, en presencia y ausencia de CaCl_2 o MgCl_2 (10 mM). Para ello, se inocularon 0,2 ml de un cultivo de 16-18 hs de la cepa sensible en 5 ml de caldo MRS, con y sin Ca^{2+} ó Mg^{2+} , y se agregó 0,1 ml de un filtrado de alto título del fago. Luego, se incubaron en estufa a 37°C. Paralelamente, se incubaron tubos control de la cepa bacteriana sin infectar con el fago en el mismo medio, para monitorear el desarrollo normal del cultivo.

El ensayo consistió en el seguimiento, en forma visual, del desarrollo del cultivo infectado por un período de tiempo tal que permita un buen crecimiento en el tubo control, detectando la ocurrencia o no de lisis del cultivo, en presencia o ausencia de los cationes ensayados.

Los tubos en los que no se observó lisis, se repicaron por dos días sucesivos, partiendo de los tubos correspondientes del día anterior y continuando con el monitoreo visual.

Formación de placas de lisis en medio agarizado

A fin de analizar el efecto del calcio y el magnesio en la formación de placas de lisis, se realizaron recuentos de partículas fágicas en MRS agarizado (adicionado de glicina 100 mM), tal cual y con el agregado de CaCl_2 (10 mM) o MgCl_2 (10 mM).

En la comparación se analizó la morfología de las placas de lisis (diámetro, definición, bordes, forma) y el recuento de partículas fágicas (título) obtenido. Se calculó la eficiencia de plaqueo (EOP, *efficiency of plaquing*), con relación a los recuentos obtenidos en presencia de calcio, según la siguiente fórmula:

$$\text{EOP} = \frac{\text{Título fágico en el medio en estudio [ufp/ml]}}{\text{Título fágico en medio MRS-Ca (10 mM) [ufp/ml]}}$$

II.5.2.2 Determinación del espectro de huéspedes

Con el objeto de conocer el espectro de cepas sensibles para los fagos de colección (PL-1 y J-1), para el fago $\phi 393/A2$, y para los fagos aislados de la planta industrial (MLC-A, MLC-A2, MLC-A6 y MLC-A7R), se emplearon las cepas que se indican en la Tabla 4 y

se aplicaron dos metodologías: Test de Turbidez y Spot Test (Svensson y Christiansson, 1991), descritos previamente en los puntos II.4.4 y II.4.5.

Para determinar el espectro de huéspedes se usaron suspensiones de alto título de los fagos indicados, por lo que se modificó ligeramente la metodología antes descrita para las sensibilidades en medio líquido, agregando en este caso alícuotas de 0,1 ml de cada filtrado a los tubos correspondientes (5 ml de caldo MRS-Ca adicionados de 0,2 ml de cultivo desarrollado de la cepa a ensayar). Una cepa se considera sensible si el cultivo lisa al menos en el tercer repique de sensibilidad, de lo contrario se considera resistente al fago en cuestión. Debido a que se parte de una suspensión de fagos de alto título, si la lisis se produce en el segundo o tercer repique podría ser indicador de algún grado de resistencia al fago por parte de la cepa.

Los ensayos en medio agarizado (Spot test) se realizaron tal como se explicara antes, pero empleando suspensiones celulares preparadas por adición de distintos volúmenes (0,2 - 0,5 ml) de un cultivo desarrollado por 16-18 hs en 5 ml de caldo MRS fresco, en función de la velocidad de desarrollo de cada cepa en particular. Una cepa se considera sensible al fago ensayado si, en el sitio donde se depositó la gota, aparece una zona de inhibición (zona de lisis).

II.5.2.3 Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus casei*/*paracasei* en caldo MRS.

Influencia del calcio y de la dosis infectiva

Se estudió la influencia del ión calcio y de diferentes dosis infectivas de fagos en el desarrollo de las cepas en medio líquido. Se estudiaron los siguientes sistemas fago / cepa: ϕ J-1/*Lb. casei* ATCC 27139; ϕ J-1/*Lb. paracasei* A; ϕ PL-1/*Lb. paracasei* A; ϕ PL-1/*Lb. paracasei* ATCC 27092 y ϕ MLC-A/*Lb. paracasei* A.

Cultivos de las cepas sensibles, incubados 16-18 hs en caldo MRS, se inocularon al 2% v/v en erlenmeyers conteniendo caldo MRS con y sin adición de CaCl_2 10mM (concentración final), agregándose luego el fago en estudio a diversas dosis infectivas (m.o.i. variables entre 1.10^{-3} y 6,6 en función del sistema en estudio). A continuación, y luego de una

homogeneización suave, los cultivos infectados se distribuyeron en alícuotas de aproximadamente 10 ml, en tubos estériles, y se incubaron en baño termostatzado a 37°C. Los tubos fueron agitados periódicamente y a intervalos de tiempo regulares, se efectuaron mediciones de D.O._{560 nm} en espectrofotómetro (Metrolab M1700, Mercosur) (Séchaud y col., 1989). Con los datos recogidos se construyeron curvas de desarrollo en función del tiempo, para cada condición. Se utilizó como control un cultivo de la cepa sin infectar, inoculada (2%) en caldo MRS-Ca e incubada en idénticas condiciones.

II.5.2.4 Ciclos de multiplicación fágica (*Burst size*)

Se determinaron los parámetros de multiplicación fágica para los siguientes sistemas fago/cepa: ϕ J-1/*Lb. casei* ATCC 27139, ϕ J-1/*Lb. casei* ATCC 393, ϕ J-1/*Lb. paracasei* A, ϕ PL-1/*Lb. casei* ATCC 393, ϕ PL-1/*Lb. paracasei* A, ϕ MLC-A/*Lb. paracasei* A.

Con este objetivo, se prepararon cultivos de las cepas sensibles, incubándolos a 37°C en caldo MRS, hasta una turbidez adecuada (D.O._{560 nm} = 0,5). Las células se cosecharon por centrifugación y el pellet se resuspendió en caldo MRS-Ca (1/5 del volumen inicial). Luego, 1 ml de cada suspensión bacteriana se infectó con el fago (m.o.i. = 0,4 - 1,5) y se incubó por 30 minutos a 37°C en baño termostatzado. De este modo se logra una adsorción superior al 90% de las partículas fágicas sobre los receptores bacterianos. A continuación, la mezcla se centrifugó (10.000 g, 5 min), el pellet se resuspendió muy cuidadosamente en 10 ml de caldo MRS-Ca, y a partir de esta suspensión se efectuaron diluciones decimales en caldo MRS. Estas diluciones se hacen para evitar la readsorción de las partículas liberadas, que pudieran iniciar nuevos ciclos de multiplicación simultáneos, induciendo a error en la determinación del *burst size*. Los tubos fueron incubados a 37°C en baño de agua termostatzado, y a intervalos regulares de tiempo, se extrajeron alícuotas (100 μ l) que fueron inmediatamente tituladas sobre la cepa sensible, para conocer el número de partículas fágicas libres (Chow y col., 1988).

Los resultados se expresaron como partículas fágicas liberadas por centro de infección. El número de centros de infección está dado por el número de placas de lisis

formadas durante los primeros minutos de la infección. Durante este período, llamado fase de latencia, el número de ufp/ml se mantiene relativamente constante y corresponde al número de infecciones productivas obtenidas después de la adsorción (Birge, 1994).

Los parámetros períodos de latencia, *burst* y *burst size*, fueron calculados a partir de las curvas de crecimiento obtenidas.

Con el fin de poder llevar a cabo este estudio para el sistema ϕ PL-1/*Lb. paracasei* A, el método fue modificado, como sigue: las células en fase exponencial de crecimiento se cosecharon por centrifugación y fueron resuspendidas en buffer TMG, un medio no proliferativo (con el agregado de CaCl_2 10 mM), adicionando los fagos a un m.o.i. \approx 2. Una incubación de 4,5 horas a 37°C fue necesaria para lograr una adsorción de más del 95% de las partículas fágicas. Cumplida esa etapa de adsorción, se procedió tal como se explicara anteriormente.

Se realizaron recuentos celulares de los cultivos resuspendidos en buffer TMG, para verificar ausencia de multiplicación sin pérdida de viabilidad celular. También se realizó una experiencia incubando (37°C , 9 hs) una suspensión celular en dos medios diferentes (caldo MRS y buffer TMG), durante las primeras 5 hs y luego de centrifugar y resuspender el pellet en caldo MRS, continuando la incubación por las restantes 4 hs. El objetivo de este ensayo, fue descartar la posibilidad de que la cepa necesite readaptarse (similar a una fase *lag*), luego del pasaje de buffer TMG (etapa de adsorción) a caldo MRS.

II.5.3 Caracterización de la adsorción

La cepa bacteriana en estudio fue desarrollada en caldo MRS a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial temprana ($\text{D.O.}_{560\text{ nm}} = 0,5 - 0,6$), cosechándose luego las células por centrifugación (10 min, 4.500 g). Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en caldo fresco, en la mitad del volumen original. Cada cultivo se infectó con el fago correspondiente (m.o.i. = 0,01 - 0,02) en tubos *Eppendorf* y se incubaron a 37°C en baño de agua termostático. A tiempos predeterminados se retiraron los tubos y se centrifugaron (5

min, 12.000 g, 5°C) con el objeto de separar los fagos adsorbidos de los libres. Inmediatamente, se extrajeron alícuotas de los sobrenadantes y se titularon sobre la cepa sensible (método de la doble capa agarizada) para conocer la concentración de fagos libres.

Dependiendo del tipo de factor estudiado para caracterizar el proceso de adsorción, se realizaron gráficas de fagos libres en los sobrenadantes o de porcentajes de fagos adsorbidos, en función del tiempo. En el segundo caso, los porcentajes de fagos adsorbidos se calcularon del siguiente modo:

$$\%Ads = \frac{T_i - T_f}{T_i} \times 100$$

donde: T_i , título inicial de fagos (ufp/ml) puestos en contacto con la cepa
 T_f , título de fagos (ufp/ml) libres en el sobrenadante (no adsorbidos)

Para los estudios de adsorción se conformaron 7 sistemas fago/cepa aplicando diferentes combinaciones de las especies disponibles. Estos sistemas y las cepas que se emplearon para realizar los recuentos de las partículas virales remanentes en los sobrenadantes, se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Sistemas fago/cepa empleados para el estudio de la etapa de adsorción y cepas utilizadas para realizar el recuento de las partículas fágicas.

Sistema fago/cepa	Cepa empleada para titular
φJ-1/ <i>Lb. casei</i> ATCC 27139	<i>Lb. casei</i> ATCC 27139
φJ-1/ <i>Lb. casei</i> ATCC 393	<i>Lb. casei</i> ATCC 27139
φJ-1/ <i>Lb. paracasei</i> A	<i>Lb. casei</i> ATCC 27139
φPL-1/ <i>Lb. casei</i> ATCC 393	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092
φPL-1/ <i>Lb. paracasei</i> A	<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092
φMLC-A/ <i>Lb. paracasei</i> A	<i>Lb. paracasei</i> A
φMLC-A/ <i>Lb. casei</i> ATCC 27139	<i>Lb. paracasei</i> A

II.5.3.1 Influencia del calcio

Se procedió como en un ensayo de adsorción típico, pero en este caso se utilizaron dos alícuotas de las células en suspensión, a una de las cuales se le adicionó calcio y a la otra, no. Se realizaron recuentos de partículas fágicas a 5, 15, 30 y 45 minutos. Las cinéticas de adsorción se obtuvieron graficando el porcentaje (con relación a los recuentos iniciales) de fagos presentes en el sobrenadante (fagos no adsorbidos) en función del tiempo, para ambas condiciones (con y sin Ca^{2+}).

II.5.3.2 Influencia de la temperatura

Para estudiar la dependencia de la adsorción con la temperatura de incubación, se utilizó la técnica de adsorción ya descrita, agregando CaCl_2 (10 mM) al medio, y respetando las demás condiciones de reacción (Watanabe y col., 1993; Quiberoni, 1997).

Se estableció un tiempo de adsorción de 30 min, realizando el estudio a las temperaturas de 0, 10, 20, 30, 37, 45 y 50°C. Cumplido el plazo de las incubaciones, se procedió a centrifugar los tubos *Eppendorf* y se operó tal como se indicara antes.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de partículas fágicas adsorbidas en 30 min, para las distintas temperaturas ensayadas.

En función de los resultados obtenidos sobre la cepa *Lb. paracasei* A, se estudió el efecto de temperaturas de 37, 45 y 50°C sobre la viabilidad de suspensiones de los fagos PL-1 y J-1, durante incubaciones de 6 h y de 30 min, respectivamente. Finalizadas las incubaciones, las suspensiones fágicas se titularon por el método de la doble capa agarizada. Los recuentos se compararon con los obtenidos para las suspensiones fágicas correspondientes, incubadas a temperatura ambiente.

II.5.3.3 Influencia de un tratamiento térmico sobre las células

Se analizó el efecto de un tratamiento térmico aplicado a las células bacterianas sensibles, sobre la adsorción de los fagos a sus receptores. Para ello se utilizó un cultivo obtenido tal como se explicara en el punto II.5.3, el cual, luego de ser resuspendido en la mitad de su volumen en caldo MRS, fue sometido a un calentamiento, a fin de producir la muerte de todas las células. Este tratamiento consistió en sumergir la suspensión celular en un baño de agua hirviendo, durante 2 min (Quiberoni y Reinheimer, 1998). La pérdida de viabilidad de los cultivos fue controlada inoculando (6%) la suspensión celular tratada en caldo MRS, incubando por 48-72 hs a 37°C y monitoreando la presencia o no de turbidez, debido al desarrollo de las células bacterianas. En medio agarizado, la viabilidad se evaluó por estriado del cultivo tratado en placas de agar MRS, las cuales se incubaron por 48-72 hs a 37°C y luego, se observaron para detectar eventuales colonias desarrolladas.

Posteriormente al tratamiento térmico, se procedió al agregado de CaCl₂ (10 mM) a la suspensión celular.

El ensayo de adsorción se realizó tanto sobre células tratadas como sin tratamiento (control en MRS-Ca), siguiendo los pasos de una experiencia tipo y realizando recuentos a 5, 15, 30 y 45 minutos.

Los resultados se expresaron como porcentajes de fagos no adsorbidos, con relación al número inicial de fagos puestos en contacto con las células, y se graficaron en función del tiempo.

II.5.3.4 Influencia del pH

El efecto de este parámetro sobre la adsorción se estudió empleando caldo MRS a diferentes valores de pH, ajustado post esterilización con soluciones concentradas de NaOH o HCl. Se utilizó la técnica de adsorción ya descrita, agregando CaCl₂ (10 mM) al medio y respetando las demás condiciones de reacción. Se eligieron aquellos valores de pH para los cuales no se produjo una importante pérdida de viabilidad, considerando los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad fágica a distintos pH (a 37°C). Para los fagos de

colección (PL-1 y J-1), los valores de pH ensayados se ubicaron entre 5 y 10; en cambio, para el fago autóctono MLC-A, también se incluyó el pH 4. Se incubó 30 min a 37°C y luego se procedió a centrifugar los tubos *Eppendorf*, operándose como se indicara en II.5.3. Los resultados fueron expresados como porcentaje de adsorción en 30 min, para los distintos pH ensayados.

En función de los resultados obtenidos para la cepa *Lb. paracasei* A fue necesario monitorear la viabilidad de la cepa en caldo MRS ajustado a distintos valores de pH. A tal fin, se preparó la suspensión celular tal como se indicara previamente para los ensayos de adsorción, pero la resuspensión se realizó en caldo MRS-Ca a pH 4, 6, 8 y 10, así como también en caldo MRS sin ajuste de pH, a modo de control. Las suspensiones se incubaron a 37°C, en baño termostático, durante 30 min. Cumplido ese tiempo, se realizaron inmediatamente recuentos celulares en agar MRS, que fueron incubados a 37°C por 48 hs.

II.5.3.5 Adsorción del fago PL-1 sobre *Lactobacillus paracasei* A

Como este sistema se comportó de un modo muy particular, los ensayos de adsorción debieron ser modificados como se describe a continuación.

Debido a los largos tiempos de incubación requeridos para lograr porcentajes de adsorción de 97-99%, el cultivo de cepa sensible ($D.O_{560\text{ nm}} = 0,5$), luego de ser centrifugado, fue resuspendido en buffer TMG con el objeto de evitar que prosiga su desarrollo. Si el cultivo se resuspendiera en caldo MRS al igual que en las experiencias anteriores, sería posible que los fagos titulados en el sobrenadante no correspondieran sólo a los no adsorbidos, sino también a los pertenecientes a la progenie proveniente de los fagos, agregados inicialmente a las suspensiones celulares, y que fueron capaces de culminar su ciclo lítico.

Debido a que fue necesario realizar las incubaciones de este cultivo infectado por un período de tiempo total de aproximadamente 8,5 - 9 hs, se realizaron controles en buffer TMG con un cultivo puro de la cepa *Lb. paracasei* A. Para evaluar si el cultivo mantenía su

viabilidad sin multiplicarse, alícuotas de la suspensión celular se incubaron a 37°C en baño termostático y se retiraron cada hora para realizar recuentos de células viables.

Para estudiar el efecto de los iones Ca^{2+} , se empleó buffer TMG con y sin el agregado de CaCl_2 (10 mM). El buffer TMG con calcio también se empleó para evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre las células (el calcio se adicionó post-tratamiento) y de la temperatura. En lugar de incubaciones de 30 min, para este último factor, la incubación para la adsorción fue de 6 hs. Debido a lo prolongado de la incubación y para interpretar los resultados obtenidos, se llevó a cabo un control de viabilidad de las partículas fágicas incubando suspensiones a 37°C, 45°C y 50°C durante 6 hs, en buffer TMG y a concentraciones similares a las empleadas en los ensayos de adsorción (aproximadamente 10^6 ufp/ml).

II.5.4 Estudios sobre paredes celulares

Se obtuvieron paredes celulares a partir de cultivos de las cepas *Lb. casei* ATCC 393 y *Lb. casei* ATCC 27139. La adsorción sobre las paredes de *Lb. casei* ATCC 393 se estudió con los fagos PL-1 y J-1, mientras que las paredes de *Lb. casei* ATCC 27139 se emplearon con los fagos J-1 y MLC-A. En todas las experiencias los recuentos de partículas fágicas se realizaron sobre las células sensibles específicas correspondientes a cada fago, es decir: para J-1 se tituló sobre *Lb. casei* ATCC 27139; para PL-1, sobre *Lb. paracasei* ATCC 27092 y para MLC-A, sobre *Lb. paracasei* A.

II.5.4.1 Preparación de las paredes celulares

La obtención de paredes celulares se realizó de acuerdo a Quiberoni y col. (2000).

A partir de un cultivo incubado durante 16-18 hs en caldo MRS de cada una de las cepas en estudio, se inoculó (3%) un volumen de caldo MRS. Se incubó a 37°C hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{560 \text{ nm}} = 0,5 - 0,8$. Se recolectaron las células por centrifugación a 5.000 g por 10 min. Luego de separar el sobrenadante, se lavó el pellet en 1/10 del volumen inicial con buffer fosfato (10 mM, pH 6,8) dos veces, centrifugando luego de cada lavado 10-15 min a

5.000 *g*. Se resuspendieron las células en buffer fosfato (1/12 del volumen inicial) y se colocaron en tubos FALCON (de 50 ml de capacidad) 25 ml de la suspensión de células, agregando 10 *g* de perlas de vidrio estériles (diámetro 0,10-0,15 mm) a 4°C. Esta proporción células/perlas de vidrio aseguró un suficiente espacio de cabeza (1/3) para que la rotura fuera eficaz (Ranhand 1974; Callegari 1992). Se realizó el recuento bacteriano de esta suspensión (recuento inicial) y una observación directa al microscopio óptico. Este recuento así como los siguientes, fueron realizados por una microtécnica (que se detalla hacia el final de esta metodología), debido a que un recuento tradicional en superficie o en profundidad hubiera consumido volúmenes de células demasiado importantes.

La disrupción mecánica fue realizada por agitación mecánica en Vortex durante 1,25 – 2 hs, enfriando alternadamente en baño de hielo cada 30 seg.

La efectividad de la rotura de la célula bacteriana fue seguida por microscopía óptica y confirmada por micro recuento en placa (recuento final).

Las perlas de vidrio fueron separadas del sobrenadante por sedimentación (reposo durante 2 hs a 0-4°C). Luego de este tiempo se recuperó el sobrenadante y las perlas fueron lavadas 4 veces con buffer fosfato, dejando sedimentar 2 hs luego de cada lavado, antes de separar el sobrenadante. Se juntaron todos los sobrenadantes obtenidos en un único tubo FALCON.

Las células enteras y demás detritus celulares fueron separados de las paredes por centrifugación a 3.500 *g*, durante 15 min. El pellet fue descartado y el sobrenadante, conteniendo las paredes celulares, fue centrifugado a 12.000 *g* durante 15 min (4°C), con el objetivo de recolectar las paredes crudas. Sobre éstas se aplicó un tratamiento enzimático con el fin de eliminar los restos del contenido citoplasmático y, de esta manera, obtener las paredes limpias. Para ello, se resuspendieron las paredes en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), y se trataron con DNAsa (0,10 mg/ml) y RNAsa (0,15 mg/ml) (ambas soluciones se prepararon en agua bidestilada estéril), incubando 30 min en baño de agua a 37°C. El pellet obtenido (12.000 *g*, 15 min, 4°C) fue lavado 8 veces con buffer fosfato (10 mM, pH 6,8), centrifugado a 12.000 *g* (2 min, 5°C), descartando el sobrenadante luego de cada lavado. El

objetivo fue eliminar los restos de citoplasma y enzimas contenidos en las preparaciones de paredes.

Una vez finalizado este tratamiento se obtuvieron las paredes celulares puras que, luego de ser concentradas por centrifugación a 12.000 g durante 15 min ($4^{\circ}C$) y descartado el sobrenadante, se almacenaron a $-20^{\circ}C$ (Quiberoni y col., 2000).

II.5.4.2 Microtécnica de recuento bacteriano en placa

Se empleó caldo de cultivo para realizar las diluciones decimales del cultivo bacteriano. En una caja de Petri dividida en cuartos, se dispuso una base de agar MRS. Sobre cada cuadrante, se volcó una mezcla de 100 μ l de la dilución de las células y 1 ml de *soft agar* MRS. Se incubó a $37^{\circ}C$ por 48 hs y se realizaron los recuentos de las ufc/ml considerando para el cálculo, la dilución efectuada.

II.5.4.3 Calibración de las paredes celulares

Se realizó para conocer la cantidad de pared celular a utilizar, de modo que se cumpla con la condición de adsorber al menos el 90% de las partículas fágicas, cuando se trabaja con una concentración aproximada de 10^6 ufp/ml (Valyasevi y col., 1990; Callegari 1992). Para ello, se resuspendió el pellet de paredes celulares puras en 1 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) con adición de $CaCl_2$ para lograr una concentración final de 10 mM (Tris-HCl-Ca) y se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} . Se infectó cada dilución con una suspensión fágica, de modo que la concentración final resultara de aproximadamente 10^6 ufp/ml, y se incubaron en baño termostático a $37^{\circ}C$ por 30 min, junto con un control de fago en Tris-HCl-Ca. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron los *Eppendorf* a 12.000 g por 15 min ($4^{\circ}C$) y se titularon los fagos libres presentes en el sobrenadante. Para cada dilución ensayada, se calculó el porcentaje de adsorción teniendo en cuenta el título de fagos iniciales agregados (control de fagos).

II.5.4.4 Tratamientos selectivos sobre las paredes celulares

Conocida la dilución de trabajo adoptada en función de la calibración realizada, se resuspendió el *stock* almacenado a -20°C en buffer tris-HCl (50 mM, pH 7,5), y se tomó la cantidad adecuada, repartiéndose alícuotas (volumen inicial) en cinco tubos *Eppendorf*, en los cuales se realizaron los siguientes tratamientos:

- **Mutanolisina** (50 U/ml en agua bidestilada estéril): 30 min a 37°C . Transcurrido ese tiempo se inactivó la enzima colocando los tubos a 100°C durante 3 min y enfriando rápidamente en baño de hielo.
- **Proteinasa K** (0,1 mg/ml en agua bidestilada estéril): 30 min a 37°C , sumergiendo luego en baño de hielo para detener la reacción.
- **SDS** (1 %): 30 min a 37°C , sumergiendo luego en baño de hielo para detener la reacción.
- **Ácido tricloroacético (TCA, 5%)**: 15 min a 90°C , sumergiendo en baño de hielo para detener la reacción.

Control de adsorción: se realizó sobre paredes celulares resuspendidas en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), sometidas a los mismos lavados que las paredes tratadas enzimática o químicamente. Este control se hizo con el objetivo de asegurar que no se produjera pérdida de material durante los lavados. Su tasa de adsorción debe ser igual o mayor al 90%.

Luego de completarse los tratamientos individuales, las paredes tratadas y las paredes control fueron lavadas 10 veces con buffer fosfato (10 mM, pH 6,8), centrifugando a 12.000 g y descartando el sobrenadante luego de cada lavado. Sólo las paredes tratadas con solución de TCA fueron lavadas por única vez con buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5).

Finalizados los lavados, los pellets de las paredes fueron resuspendidos en tris-HCl, en los volúmenes iniciales correspondientes, y se congelaron a -20°C para ser usadas luego en los ensayos de adsorción.

II.5.4.5 Tratamientos térmicos realizados sobre las paredes control

Sobre alícuotas de las paredes control resuspendidas, una en Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y otra, en MRS, se realizó un tratamiento térmico, colocando los tubos *Eppendorf* en agua a ebullición durante 2 minutos e, inmediatamente, en baño de hielo.

Idéntico tratamiento térmico se realizó sobre preparaciones de **células enteras** de las cepas *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. casei* ATCC 393, tal como se explicó en las experiencias antes descritas de adsorción, pero **resuspendidas en buffer Tris-HCl** en lugar de caldo MRS. Las células enteras así tratadas se emplearon en ensayos de adsorción como los descritos en la sección II.5.3.

II.5.4.6 Ensayos de adsorción

Las paredes tratadas y el control de paredes sin tratar se utilizaron a la dilución adecuada, según la calibración realizada, y empleando como diluyente buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Se adicionó CaCl_2 (10 mM) y 0,1 ml de una dilución del fago, para que la concentración en el medio de reacción sea de 10^6 ufp/ml. Se incubó 30 min a 37°C en baño de agua, y luego de este tiempo se centrifugó 10 min a 12.000 g. El sobrenadante fue titulado por el método de la doble capa agarizada, y el porcentaje de fagos adsorbidos fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{Ads} = \frac{T_i - T_f}{T_i} \times 100 \quad \text{donde: } T_i, \text{ título inicial de fagos (ufp/ml) puestos en contacto con las paredes celulares de la cepa sensible}$$

$$T_f, \text{ título de fagos (ufp/ml) libres en el sobrenadante (no adsorbidos sobre las paredes celulares)}$$

II.5.4.7 Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas

El estudio se realizó según la técnica descrita por Valyasevi y col. (1990), modificada como se indica a continuación. Se repartieron alícuotas (a la dilución de trabajo) de paredes control sin tratamiento en tubos *Eppendorf*. Se les adicionó CaCl_2 (10 mM) y 0,1 ml de una

dilución del fago, para que la concentración en el medio de reacción sea de 10^6 ufp/ml. Además, se realizó un control de fagos sin agregado de paredes celulares para poder calcular los porcentajes de adsorción. Todos los tubos *Eppendorf* se incubaron a 37°C y el primero se tituló a los 30 min, para tener un control de adsorción. Posteriormente, a intervalos de tiempo regulares, se titularon las distintas ufp/ml libres. De esta manera, se obtuvo una primera aproximación del grado de reversibilidad en la unión de los fagos a los receptores.

Los resultados fueron expresados como ufp/ml libres a diferentes tiempos, en comparación con las ufp/ml inicialmente puestas en contacto con las paredes celulares.

II.5.4.8 Ensayos de neutralización fágica con monosacáridos

Estos estudios se hicieron a fin de determinar la capacidad de ciertos monosacáridos de inactivar a las partículas virales, impidiendo su adsorción posterior sobre sus receptores específicos.

Se ensayaron los siguientes monosacáridos, que habitualmente se encuentran formando parte de receptores fágicos en bacterias lácticas: D(+)-glucosa anhidra, D(+)-galactosa, D(+)-manosa, L(+)-ramnosa monohidrato, D(-)-ribosa, D(+)-glucosamina y N-acetilglucosamina.

Alícuotas de 0,9 ml de la solución del monosacárido a testear, usando como diluyente Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y con el agregado de CaCl_2 (10 mM) (Valyasevi y col. 1990), fueron adicionadas de 0,1 ml de la suspensión fágica conteniendo 10^7 ufp/ml. La concentración de monosacáridos utilizada fue de 500 mM. Luego de 30 min de incubación a 37°C , se titularon las partículas fágicas libres por medio del método de la doble capa agarizada. El porcentaje de inhibición fue calculado considerando el número de ufp/ml adicionado a tiempo cero (T_i), y el número de ufp/ml libres luego de los 30 min de incubación (T_f):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{T_i - T_f}{T_i} \times 100$$

Ya que estas experiencias no resultaron reproducibles para ninguno de los tres fagos estudiados (PL-1, J-1 y MLC-A), se diseñaron otras que utilizaron algunos monosacáridos particulares y que se explicitan a continuación.

II.5.4.9 Ensayos de desorción y competencia con monosacáridos, en la adsorción de los fagos sobre las paredes celulares.

Los ensayos de competencia consisten en contactar las partículas fágicas con las paredes celulares que se encuentran resuspendidas en una solución de los monosacáridos. La competencia se produciría entre las moléculas de monosacárido (libres en la solución) y aquéllas presentes en el receptor, en caso de que el monosacárido testeado sea idéntico o similar a los constituyentes del receptor. Los fagos tendrían entonces, la posibilidad de unirse tanto a los monosacáridos libres, como de adsorberse sobre las paredes celulares y ser luego removidos mediante una centrifugación. Tal situación se evidenciaría por un aumento de los fagos titulados en el sobrenadante y por ende, disminuciones en los porcentajes de adsorción calculados.

Los ensayos de desorción constan de una primera etapa de adsorción de los fagos a las paredes celulares, en donde se logra la unión de la mayor parte de las partículas. En una segunda etapa, se adiciona una solución del monosacárido y se continúa la incubación. Los fagos del sobrenadante se titulan a dos tiempos y estos recuentos corresponden a fagos no adsorbidos y a los que pudieran haber sido desorbidos por acción del monosacárido probado, ya que en ensayos anteriores se comprobó que en los tiempos de la experiencia no existe una tendencia hacia la desorción espontánea.

Los recuentos alcanzados en los dos tipos de ensayos se comparan contra los obtenidos para la adsorción de fagos sobre paredes celulares purificadas.

Estos ensayos se realizaron sobre paredes celulares control sin tratamiento para *Lb. casei* ATCC 27139 con J-1, *Lb. casei* ATCC 393 con los fagos PL-1 y J-1; y *Lb. casei* ATCC 27139 con MLC-A y se diseñaron sobre la base de técnicas empleadas anteriormente para

fagos de *Lb. casei* / *paracasei* (Yokokura, 1971; Watanabe y Takesue, 1975), modificadas de la siguiente manera.

Las adsorciones se llevaron a cabo tal como se indicara en el punto II.5.4.6, en un volumen final de 1 ml. A su vez, se preparó un control de fagos, sin paredes, para conocer la concentración inicial de fagos adicionadas en el ensayo y calcular los porcentajes de adsorción. Cumplidos los 30 min de incubación a 37°C, los tubos *Eppendorf*, conteniendo las paredes celulares control, se homogeneizaron con suavidad e inmediatamente se alicuotaron en otros 3 nuevos tubos *Eppendorf* con volúmenes de 500, 200 y 200 µl. Los tubos de 500 µl se centrifugaron (13.000 g, 10 min, 4°C) y sus sobrenadantes se titularon para obtener los valores de adsorción control a 30 min. A los 2 tubos *Eppendorf* con 200 µl, se les adicionaron 200 µl de una solución (en Tris-HCl) de L-ramnosa o de D-ribosa (500 mM), y se incubaron a 37°C. Uno de los tubos se retiró a los 5 min y su sobrenadante se tituló inmediatamente. El restante, se retiró a los 60 min, procediéndose de igual modo. Por comparación con los valores de adsorción a 30 min, se obtuvo información del efecto que presentan cada uno de los dos hidratos de carbono en la desorción de los fagos adsorbidos sobre los receptores presentes en las paredes celulares, a ambos tiempos.

Paralelamente, y a partir del tiempo cero de estas experiencias, se realizó el ensayo de competencia entre los azúcares y los receptores, por parte de los fagos. Para ello, se procedió tal como se indicara en el punto II.5.4.6, pero empleando en lugar de Tris-HCl como diluyente, una solución de L-ramnosa o de D-ribosa tal que la concentración final de los azúcares en los tubos de adsorción fuera 250 mM y en un volumen final de 500 µl. Cumplidos los 30 min de una incubación a 37°C, los tubos *Eppendorf* se centrifugaron para titular los fagos presentes en los sobrenadantes. Por comparación con los títulos correspondientes a los controles de adsorción, en Tris-HCl, a 30 min (descritos en la primera parte), se pudo evaluar la competencia de los azúcares con los receptores presentes en las paredes celulares, por la adsorción de los fagos.

II.6 Aislamiento de mutantes espontáneos fago resistentes

II.6.1 Aislamiento a partir de cultivos secundarios y de medio agarizado

El aislamiento de mutantes resistentes a partir de cepas sensibles se realizó para *Lb. paracasei* A y su fago específico MLC-A, y para *Lb. casei* ATCC 27139 y su fago J-1. En el caso de la cepa comercial, se realizaron dos intentos para buscar mutantes: en primera instancia se aplicaron para el aislamiento, una técnica que emplea medio agarizado y otra, en medio líquido (cultivo secundario). En una segunda etapa, sólo se aplicó la metodología de aislamiento por cultivo secundario. En cambio, en el caso de las variantes obtenidas frente a J-1, se siguió directamente la metodología de cultivo secundario, debido a que ésta arrojó mayores rendimientos en mutantes fago resistentes, según estudios realizados sobre otras bacterias lácticas.

Cultivos secundarios

Un cultivo de la cepa sensible incubado por 16-18 hs, fue inoculado al 2% en caldo MRS-Ca e infectado con una suspensión fágica de alto título, a diversas dosis infectivas (m.o.i. = 5.10^{-4} - 1,6). Durante la incubación a 37°C, se monitoreó la evolución de los cultivos infectados, comparándolos con un control de la cepa sin infectar. Se seleccionaron aquellos cultivos que lisaron completamente en el transcurso del día, y que evidenciaron desarrollo posterior (cultivo secundario), luego de 72-144 hs adicionales a 37°C. Seguidamente, esos cultivos se estriaron en placas de agar MRS, se incubaron (48 hs, 37°C) y se aislaron clones a partir de las colonias obtenidas (Callegari, 1992; Carminati y col., 1993).

A partir de medio agarizado

Volúmenes de 0,3 ml de cultivo de cada cepa sensible, incubados 16-18 hs en caldo MRS, fueron adicionados, a diferentes dosis infectivas (m.o.i. = 5.10^{-4} - 0,1), de los fagos específicos y 3 ml de MRS *soft agar*. Estas mezclas, suavemente homogeneizadas, se volcaron sobre cajas de Petri conteniendo agar MRS-Ca-Gli. Luego de una incubación en microaerofilia a 37°C durante 16-18 hs, se observó el desarrollo del cultivo infectado. Se seleccionaron las placas que mostraron lisis completa del cultivo luego de 24 hs de incubación, descartándose las

restantes. Se continuó la incubación de las placas seleccionadas para permitir el desarrollo de colonias resistentes a partir del cultivo lisado. Se aislaron las colonias obtenidas, que fueron considerados como probables variantes fago resistentes (Reinheimer y col., 1993).

Los clones aislados fueron purificados y separados de las partículas fágicas presentes mediante tres estriados sucesivos (agar MRS).

II.6.2 Caracterización del fenotipo de fago resistencia para los mutantes obtenidos

II.6.2.1 Confirmación de la fago resistencia

Los mutantes espontáneos obtenidos, potencialmente fago resistentes, se testearon en un ensayo de sensibilidad en caldo MRS-Ca, frente a sus fagos específicos. Se consideraron resistentes aquellos clones que luego de tres repiques de sensibilidad sucesivos, no evidenciaron lisis.

Debido a que la totalidad de los clones aislados en primera instancia, empleando el fago MLC-A y ambas metodologías descritas, fueron descartados siguiendo el criterio mencionado, fue necesario implementar una metodología alternativa con el fin de intentar la recuperación de mutantes. Por lo tanto, con los clones aislados en la segunda instancia (sólo por cultivo secundario), se procedió como se indica a continuación: Se comenzó con el primer repique de sensibilidad empleando como inóculo cultivos de los clones potencialmente resistentes. Los tubos que lisaron durante este repique se mantuvieron en incubación hasta el día siguiente, en lugar de eliminarlos por ser considerados sensibles, para permitir el desarrollo de nuevos mutantes, sobre los que se realizó un nuevo ensayo de sensibilidad. Se consideraron resistentes, aquellos clones que superaron este segundo ensayo (no presentando lisis hasta el tercer repique).

Para los clones aislados empleando el fago J-1 por aplicación de cultivos secundarios, se caracterizó el fenotipo de fago resistencia implementando directamente la última de las metodologías detalladas.

II.6.2.2 Estabilidad de la fago resistencia

Este ensayo se realizó con los clones que se confirmaron como resistentes al fago específico frente al cual se obtuvieron.

Cultivos de los clones resistentes, incubados durante 16-18 hs a 37°C, se inocularon en caldo MRS-Ca, luego se infectaron con una suspensión de fagos (m.o.i. = 1,4) y se incubaron a 37°C. En el transcurso del día, se siguió el desarrollo de los cultivos infectados comparándolos con un control del clon sin infectar. Los cultivos que permanecieron sin lisar se repicaron al día siguiente a caldo MRS-Ca fresco, en modo similar a un test de turbidez, pero adicionando en cada repique, una nueva dosis de suspensión de fago. De este modo, se buscó ejercer una presión fágica fuerte y continua sobre los clones que resultaron resistentes. Se consideró estable a la resistencia de aquellos clones que fueran capaces de superar 7 repiques de estabilidad. La lisis del cultivo en alguno de los repiques indicó la pérdida de la fago resistencia, de acuerdo a lo sugerido por Carminati y col. (1993).

Los clones que mostraron ser resistentes y estables fueron conservados a -20 y -80°C, tal como se detallara anteriormente, para su estudio posterior. Debido a las características muy particulares evidenciadas por estos mutantes, los viales para su conservación se prepararon a partir de cultivos de los **clones con fago** del séptimo repique de estabilidad.

II.6.2.3 Espectro de resistencia fágica de los mutantes obtenidos

Se estudió con el objeto de investigar si clones mutantes resistentes y estables (según la metodología clásica) de *Lb. paracasei* A y *Lb. casei* ATCC 27139, aislados frente a los fagos MLC-A y a J-1, respectivamente, también se mostraban resistentes frente a otros fagos de *Lb. casei* / *paracasei*. Los mutantes de *Lb. paracasei* A se desafiaron con los fagos de colección PL-1 y J-1, mientras que los clones de *Lb. casei* ATCC 27139 fueron enfrentados con los fagos PL-1 y MLC-A.

Para ello se realizaron ensayos de sensibilidad, según la metodología tradicional y tal como se detallara anteriormente en el punto II.5.2.2, pero considerando los siguientes aspectos: se reactivaron los cultivos **infectados** congelados de clones que resultaron

resistentes frente a los fagos MLC-A y J-1. Se emplearon 0,3 ml del cultivo reactivado de cada clon a estudiar (incubado 16-18 hs a 37°) y 0,1 ml de suspensiones de alto título de los fagos correspondientes. Se consideraron resistentes a aquellos mutantes capaces de superar los tres repiques de la sensibilidad sin presentar lisis del cultivo.

II.6.3 Nuevo criterio de estabilidad para los mutantes resistentes obtenidos

Los mutantes de *Lb. casei* / *paracasei* se comportaron de forma atípica con relación a otras cepas de bacterias lácticas estudiadas, razón por la cual se decidió modificar la metodología y establecer un nuevo criterio para caracterizar la resistencia fágica mostrada como un fenotipo estable en el tiempo.

Se descongelaron los clones (congelados a partir de cultivos infectados) que habían resultado resistentes y estables según la metodología planteada en II.6.2.2), y se procedió a la realización de tres estrías con objeto de lavar de partículas fágicas a los cultivos. Con estos clones purificados se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad (de tres repiques) frente al fago en estudio. A continuación, los tubos control (sin fago) que hubieran superado este ensayo de sensibilidad, se emplearon para realizar dos subcultivos, y luego, un nuevo ensayo de sensibilidad.

El subcultivo consistió en inocular al final del día 0,3 ml del cultivo del tubo control, desarrollado ese día, en 5 ml de caldo MRS fresco e incubarlo por 16-18 hs a 37°C. Con esto, se trata de aumentar las instancias en las cuales los clones puedan revertir sus fenotipos de resistencia en caso de no ser estables, al aumentar el número de generaciones existentes entre los sucesivos ensayos de sensibilidad.

Esta estrategia se repitió una vez más desde los subcultivos, y se consideraron estables aquellos clones resistentes capaces de desarrollar sin lisar, a lo largo de tres ensayos independientes de sensibilidad, intercalados con los subcultivos.

RESULTADOS

III RESULTADOS

III.1 Aislamiento de los bacteriofagos MLC-Ai

A partir de muestras de diversa naturaleza, enviadas por una industria que produce leche fermentada con un lactobacilo probiótico, se aislaron los primeros bacteriofagos de bacterias probióticas de nuestro país. La Tabla 6 contiene información acerca del tipo de muestra, cierta caracterización inicial y las denominaciones asignadas a los fagos aislados a partir de las mismas.

En la Fig. 10 se muestra el número de muestras de diversos orígenes analizadas con el objetivo de detectar bacteriofagos de *Lb. paracasei*, en el período de tiempo comprendido entre enero de 2003 y agosto de 2006. Se observa un aumento en el interés manifiesto por parte de esta industria, por la búsqueda de fagos no sólo en su producto (en distintos puntos del proceso de elaboración), sino también en el fermento empleado para su obtención. Más aún, a partir de mediados del año 2005 se abordó también la búsqueda de partículas fágicas infectivas en muestras de aire recogido de distintas salas, en hisopados de diferentes superficies y a mediados del año 2006, en una muestra de un producto comercial relacionado con la leche fermentada. Desde mayo del año 2005 y hasta agosto del año 2006, se detectó presencia de fagos en prácticamente el 60 % de las muestras analizadas, con una tendencia creciente a la ocurrencia de resultados positivos en los últimos tiempos.

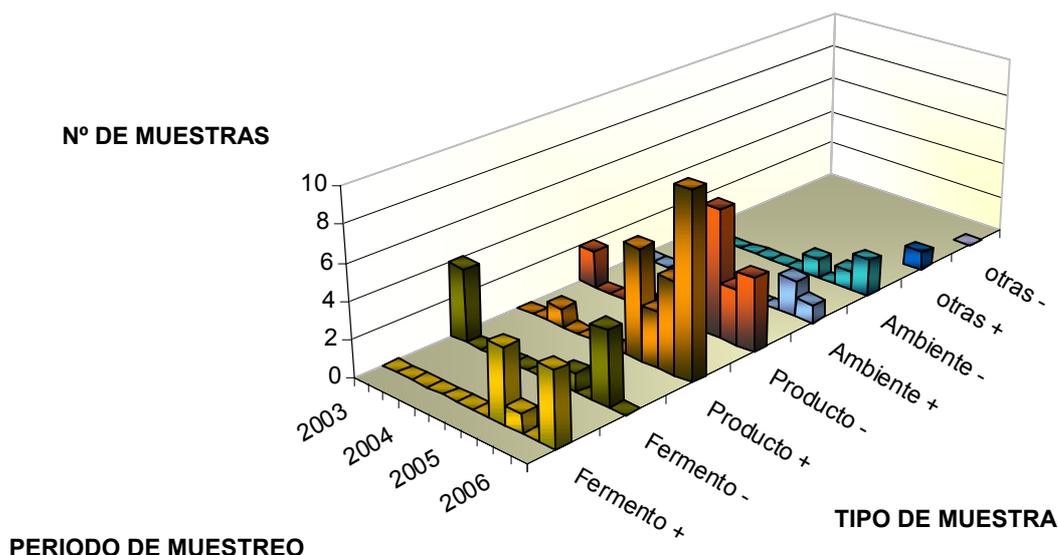


Figura 10. Frecuencia de análisis de fagos en muestras de diverso origen provenientes de una planta de elaboración de leche fermentada (para cada tipo de muestra se discriminan la presencia (+) y ausencia (-) de bacteriofagos).

Sólo en dos oportunidades se aislaron fagos presentes en las muestras, con recuento muy elevado (10^{10} ufp/ml): MLC-A y MLC-A3 (Tabla 6). En el resto de los casos, los títulos fueron inferiores a 10^7 ufp/ml y en general, comprendidos entre 10^2 - 10^4 ufp/ml (datos no mostrados).

Los fagos se seleccionaron, para su aislamiento y purificación, siguiendo ciertos criterios que se mencionan a continuación:

- a partir de diferentes eventos de infección en la industria (distintas elaboraciones),
- a partir de muestras que fueron o no calentadas durante su procesamiento,
- a partir de muestras de diversos orígenes (producto en distintas etapas de elaboración, hielo, aire, hisopado de superficies).

De los análisis en busca de bacteriofagos, a partir de las muestras provenientes de la industria, se aislaron 22 fagos (Tabla 6). Adicionalmente, durante el desarrollo de los

ensayos realizados a tal fin, ocurrieron dos sucesos atípicos que permitieron el aislamiento de los fagos pMLC-A y MLC-AC_L (en septiembre de 2005 y julio de 2006, respectivamente). En el primer caso, se observaron escasas placas de lisis individuales en un control de crecimiento de un “césped” de la cepa *Lb. paracasei* A, en placas de MRS-Ca-Gli. En el segundo caso, repitiéndose lo acontecido en octubre de 2005, se observó la lisis de un cultivo de la cepa *Lb. paracasei* A, desarrollada en caldo MRS-Ca, empleado como control en un ensayo típico de sensibilidad en medio líquido. En ambas oportunidades, fue posible seguir la metodología de purificación explicada en Materiales y Métodos y se evidenciaron placas de lisis individuales, indicando la existencia de partículas fágicas infectivas en dichos cultivos.

Tabla 6. Origen de los fagos específicos de *Lb. paracasei* A aislados a partir de muestras diversas, provenientes de una planta de elaboración de una leche fermentada

Fecha	Fago	pH	Título	Tipo de muestra	Trat. Térm.	
Dic-03	MLC-A	5,12	1,7.10 ¹⁰	TF	no	
Jul-05	MLC-A2	4,19	2,8.10 ²	TM	no	
Ago-05	MLC-A3	4,86	2,3.10 ¹⁰	TF	no	
	MLC-A3R		1,0.10 ⁵		si	
Ago-05	MLC-A4	4,30	6,1.10 ⁴	TF	no	
	fMLC-A4R		1,4.10 ²		F	si
Sep-05	fMLC-A5		10-1,0.10 ⁴ ?	F	no	
Oct-05	MLC-A6	4,11	2,0.10 ²	PT	no	
Nov-05	MLC-A7R	3,99	7,4.10 ²	PT	si	
Dic-05	MLC-A8	4,14	1,1.10 ⁴	PT	no	
	MLC-A9		5,0.10 ⁴		Hielo	no
	MLC-A10		8,6.10 ²		SSS	no
	MLC-A11R		6,0.10 ³			si
Feb-06	MLC-A12R	3,80	1,3.10 ³	TF	si	
May-06	MLC-A13	4,04	3,1.10 ³	TF	no	
May-06	MLC-A14	4,11	6,5.10 ²	PT	no	
Jun-06	fMLC-A15	6,02	?	F	no	
Jun-06	MLC-A16	4,14	6,4.10 ²	PT	no	
Jun-06	MLC-A17	4,13	9,7.10 ³	PT	no	
	fMLC-A18		5,49		F	no
Jul-06	MLC-AY	4,47	4,8.10 ⁴	Yogur	no	
Ago-06	MLC-A19	4,08	7,4.10 ²	TM	no	

TF: tanque de fermentación; TM: tanque mezcla; F: fermento; PT: producto terminado; SSS: superficie sala de siembra

Una nueva situación especial se presentó durante estos análisis con el aislamiento de fagos a partir de muestras procesadas y sometidas a un tratamiento térmico de 90°C durante 15 min. Tal fue el caso para los fagos MLC-A3R, MLC-A4R, MLC-A7R, MLC-A11R y MLC-A12R, que soportaron el tratamiento térmico realizado a las muestras en las cuales se encontraban suspendidos (más adelante se analizan resultados preliminares de la estabilidad térmica de los fagos MLC-A3R y MLC-A12R).

Otra observación de ocurrencia repetida en los análisis realizados a estas muestras, consistió en la disminución de los valores de recuento de fagos presentes con el transcurso de unos pocos días. Esa caída de los títulos se confirmó, monitoreando la evolución en el tiempo, para 7 muestras analizadas (Tabla 7). Una explicación posible sería la pérdida de viabilidad de los fagos al encontrarse resuspendidos en muestras con pH extremadamente bajos (M3 a M7) o de un medio no apropiado para la conservación de fagos (M1 y M2).

Tabla 7. Recuentos de partículas fágicas viables, presentes en muestras de orígenes diversos, realizadas a tiempo inicial y luego de 10 días.

Muestra	pH	Tipo de muestra	Trat. térmico	Título (ufp/ml)	
				día 1	día 10
M1		Hisopado de superficie de flujo laminar	no	8,6.10 ²	30
M2		Hielo de freezer	si	6,0.10 ³	4,6.10 ²
M3	3,85	TF	no	8,4.10 ⁴	9,7.10 ²
M4	3,92	TF	si	10	<10
M5	3,95	TF	si	4,0.10 ³	40
M6	3,80	TF	si	1,3.10 ³	<10
M7	4,08	PT	si	1,3.10 ³	40
				6,0.10 ³	<10

TF: tanque de fermentación; PT: producto terminado

III.2 Caracterización de los fagos

III.2.1.1 Microscopía electrónica

Los fagos PL-1, J-1 y MLC-A pertenecen al morfotipo B según Bradley (1967) y al B1 de la Familia *Siphoviridae*, según la clasificación de Ackermann y col. (1984). Poseen cápsides icosaédricas y sus dimensiones se encuentran en la Tabla 8. Los fagos de colección presentan colas flexibles, pero no contráctiles. En el caso del fago PL-1, la cola se encuentra

estriada, y en el extremo cuenta con una estructura más compleja de placa basal y fibra caudal.

Tabla 8. Dimensiones de los fagos de colección PL-1 y J-1, y del fago MLC-A. Los valores son la media de tres determinaciones.

Fago	Morfología	Cabeza		Cola	
		Diámetro (nm)	Longitud (nm)	Diámetro (nm)	
PL-1	isométrica	60	270	10	
J-1	isométrica	62	250	7	
MLC-A	isométrica	57	156	7-8	

El fago autóctono MLC-A posee una cola bastante rígida, no contráctil y también tiene una placa basal de 15 x 3 nm, a la cual se une una fibra de 20 x 2 nm. Adicionalmente, este fago presenta la particularidad de tener, en el punto de unión de la cola con la cabeza, un collar de 12 x 2 nm. Probablemente, el fago MLC-A es un miembro de la especie $\gamma 5$ de fagos de lactobacilos (Accolas y Spillmann, 1979; Ackermann y Dubow, 1987; Ackermann, 2001) (Fig. 11).

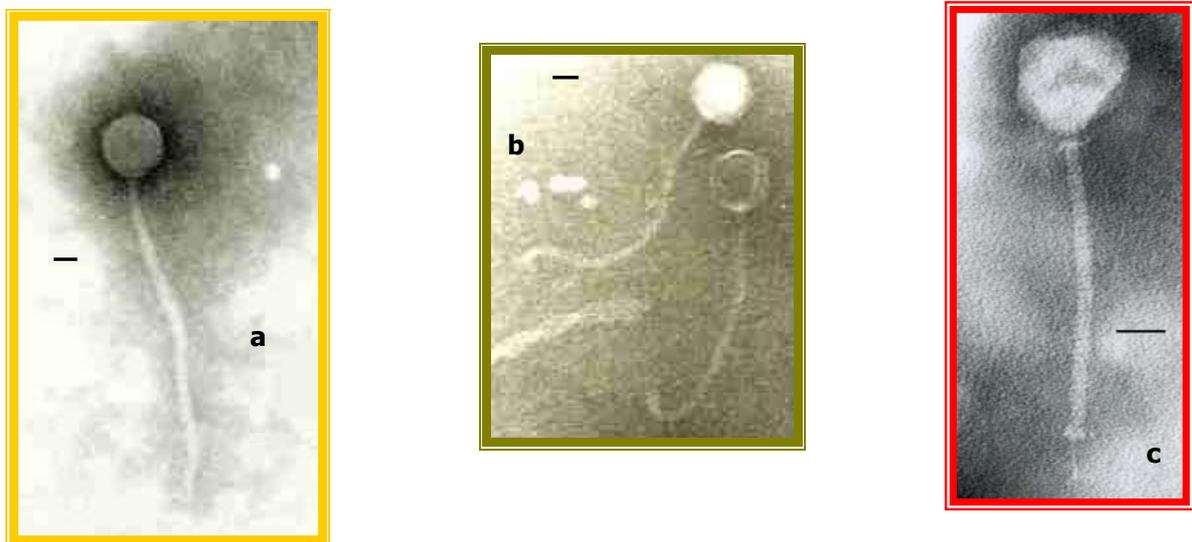


Figura 11. Micrografías electrónicas de fagos de *Lactobacillus casei* / *paracasei* a) PL-1, b) J-1 y c) MLC-A. La barra corresponde a 25 nm.

III.2.1.2 Análisis de restricción del ADN doble cadena de los fagos.

Los perfiles de restricción obtenidos con la enzima *EcoRI*, resultaron prácticamente idénticos para los fagos de colección PL-1 y J-1, a excepción de la banda de 1,8 kb. Con relación al fago $\phi 393/A2$, los tres fagos comparten varias bandas (1,2 kb; 1,4 kb; 2,8 kb; 4,0 kb y 5,3 kb), aunque se observan mayores diferencias. El fago MLC-A mostró un perfil claramente distintivo de los demás estudiados, presentando sólo una banda común (2,5 kb) con los fagos de colección y una banda de 5,7 kb, con el fago $\phi 393/A2$. En el caso de los cortes realizados empleando la enzima de restricción *HindIII*, los perfiles obtenidos para los cuatro fagos presentan diferencias más marcadas, si bien aún se observan unas pocas bandas compartidas entre algunos o varios de ellos (Fig. 12).

Por todo lo observado, se puede concluir que se trata de entidades fágicas diferentes, lo cual resulta de particular interés para el caso del fago MLC-A, aislado en nuestro país. Para este último fago, mediante la sumatoria de los tamaños de los fragmentos obtenidos luego de la digestión enzimática con *HindIII*, el tamaño del genoma se estimó en aproximadamente 37 kb.

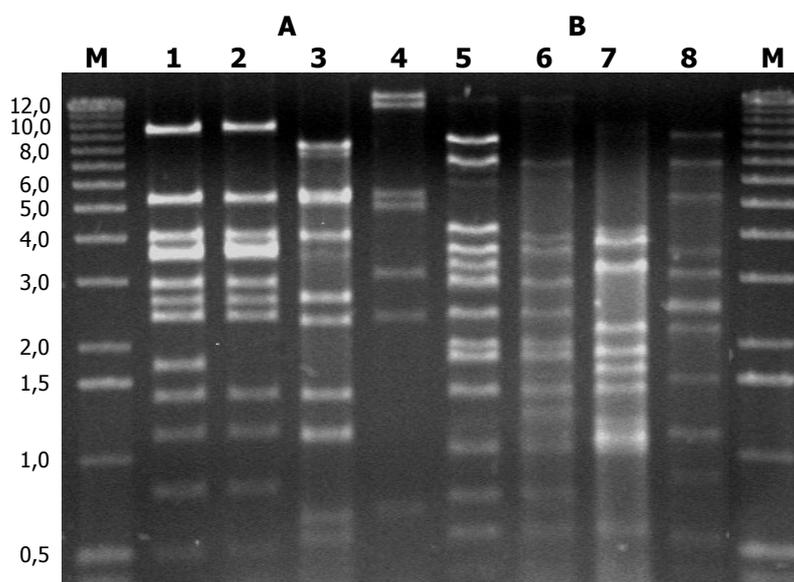


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN generados con *EcoRI*- (A) y *HindIII*- (B) de los fagos: PL-1 (calles 1 y 5), J-1 (calles 2 y 6), $\phi 393/A2$ (calles 3 y 7) y MLC-A (calles 4 y 8). Calles M, Marcador de Peso Molecular (1 kb DNA Ladder).

Con el fin de determinar la naturaleza de los sitios de empaquetamiento del fago MLC-A, se corrieron en un gel de agarosa los fragmentos de ADN provenientes de la digestión con *Hind*III, calentados (75°C – 10 min) y sin calentar. Los perfiles observados resultaron idénticos, indicando que el fago podría poseer un mecanismo de empaquetamiento del ADN del tipo *pac* (Fig. 13).

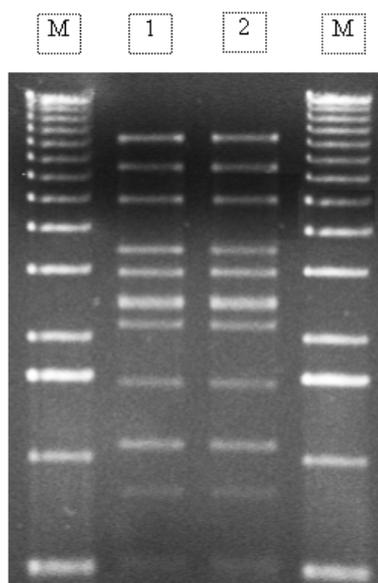


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN generados por digestión con la enzima *Hind*III del fago MLC-A, calentados (10 min, 75 °C) (calle 2) y sin calentar (calle 1). Calles M, Marcador de Peso Molecular (1 kb DNA Ladder).

III.2.1.3 Estudio de la diversidad para los fagos aislados en Argentina (fagos MLC-Ai)

Se estudió la diversidad existente entre varios fagos de *Lb. paracasei* aislados en la planta de leche fermentada, a través de comparación de perfiles de restricción de ADN. De los mismos (Fig. 14), se pudo determinar que los fagos MLC-A y MLC-A2, aislados en diciembre de 2003 y julio de 2005, respectivamente, resultaron diferentes entre sí y a los demás fagos. En un tercer grupo están los fagos restantes (MLC-A3, MLC-A3R, MLC-A4, MLC-A4R, MLC-A5, MLC-A6 y pMLC-A), que presentaron perfiles indistinguibles entre ellos, con las dos enzimas probadas, por lo que podría ser que esos aislamientos correspondan en realidad a un único fago.

Por otro lado, el primer fago aislado (MLC-A), fue el que más se diferenció del resto empleando las dos enzimas. De los perfiles logrados con *EcoRI*, sólo dos bandas son conservadas para todos los aislados, mientras que el fago MLC-A2, posee 3 bandas más que son también conservadas con los aislados del tercer grupo.

En todos los fagos, los genomas poseen más sitios para el corte con *HindIII* que para *EcoRI*, siendo las diferencias particularmente notables para los dos primeros aislados.

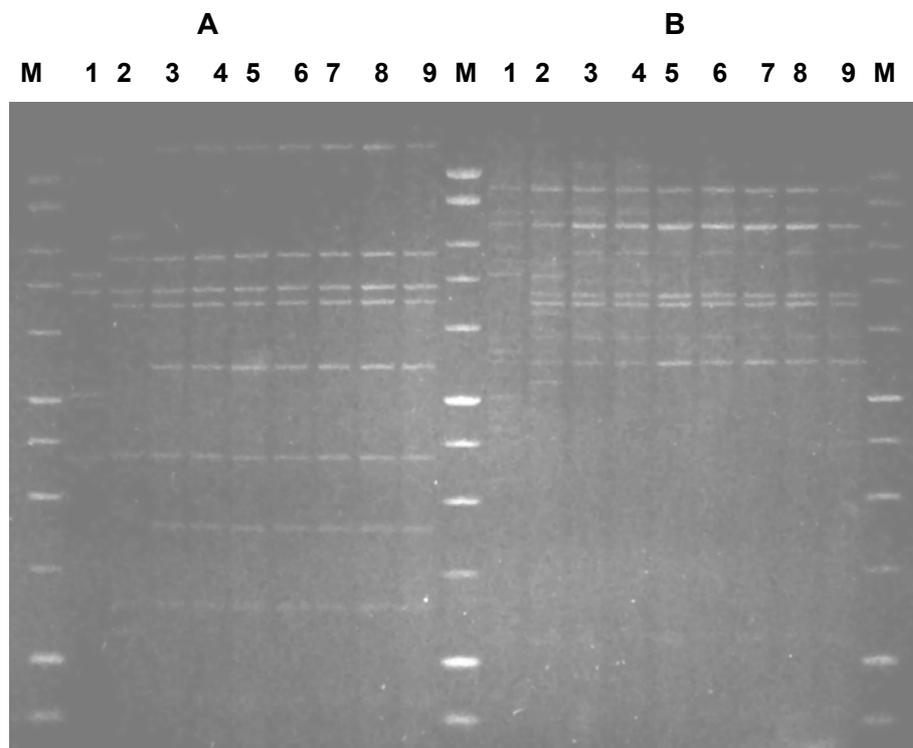


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN generados con *EcoRI*- (A) y *HindIII*- (B) de los fagos: MLC-A, MLC-A2, MLC-A3, MLC-A3R, MLC-A4, MLC-A4R, MLC-A5, MLC-A6, pMLC-A (de calle 1 a 9). Calles M, Marcador de Peso Molecular (1 kb DNA Ladder).

Los fagos MLC-A9, MLC-A10, MLC-A11R, MLC-A12R, fueron comparados con el fago MLC-A, sólo cortando con *EcoRI*. Se encontraron diferentes al primer aislado e iguales entre sí (Fig. 15).

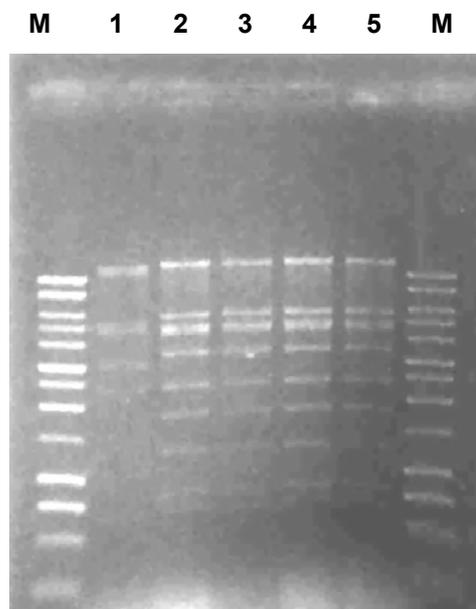


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos generados en la restricción con *EcoRI* del ADN de los fagos: MLC-A, MLC-A9, MLC-A10, MLC-A11R, MLC-A12R (de calle 1 a 5). Calles M, Marcador de Peso Molecular (1 kb DNA Ladder).

III.2.1.4 Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación

El comportamiento de los fagos estudiados bajo diferentes temperaturas de conservación, fue particular para cada caso, no evidenciándose un patrón común (Fig. 16).

En el caso de PL-1, los recuentos a 4°C y a -20°C fueron similares en el tiempo, disminuyendo en más del 60% a los cuatro primeros meses y luego, de modo más paulatino, hasta llegar a alrededor de un 10% de partículas fágicas viables a los 18 meses. Para la temperatura de -80°C, la declinación de los recuentos se produjo en forma menos pronunciada con el correr de los meses, aunque finalmente, los porcentajes de partículas viables respecto del número inicial no alcanzaron al 20% (Fig. 16 a).

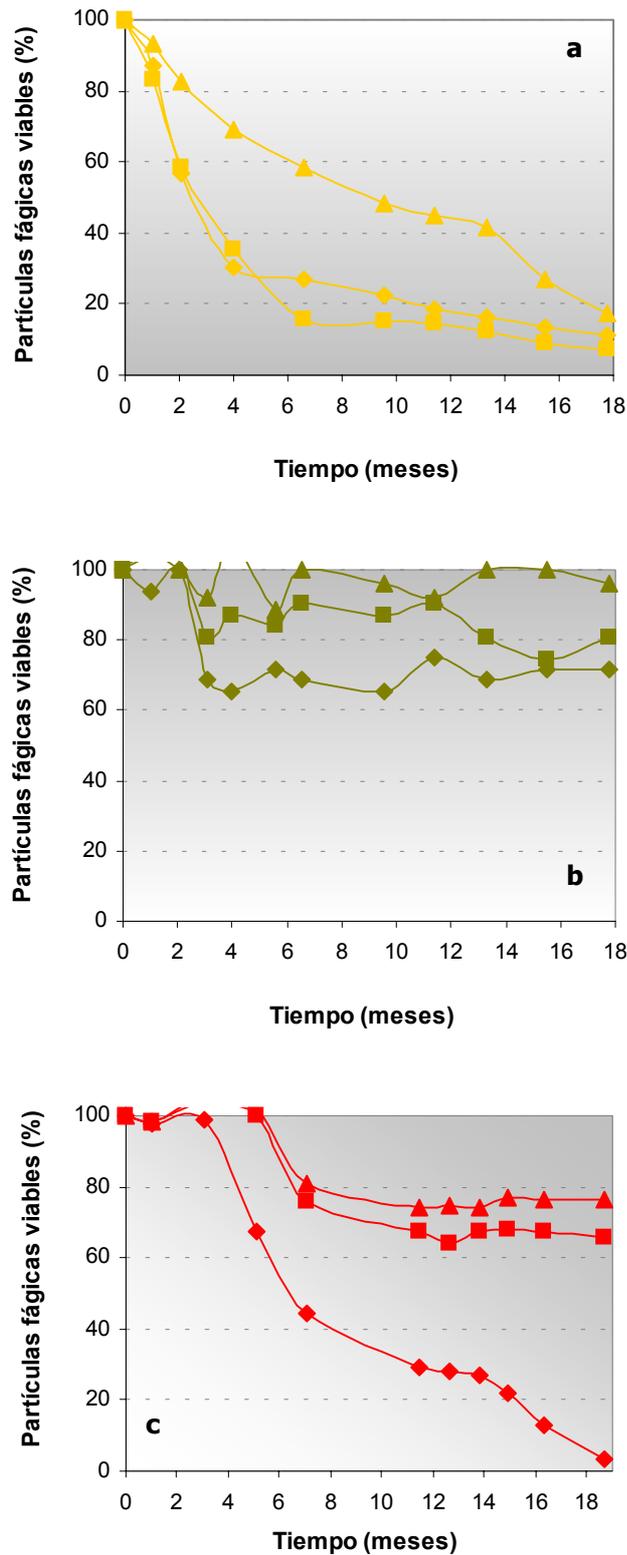


Figura 16. Viabilidad de los fagos PL-1 (a), J-1 (b) y MLC-A (c) durante el almacenamiento a 4°C (◆) en caldo MRS, -20°C (■) y -80°C (▲) en caldo MRS adicionado de glicerol 15% v/v. Los valores son la media de tres determinaciones.

Para J-1, la viabilidad a -80°C se mantuvo prácticamente inalterada durante el período de tiempo evaluado, mientras que a las otras dos temperaturas, las caídas más importantes en el número de partículas infectivas se produjeron al tercer mes, manteniéndose luego estables hasta culminar el ensayo (Fig. 16 b).

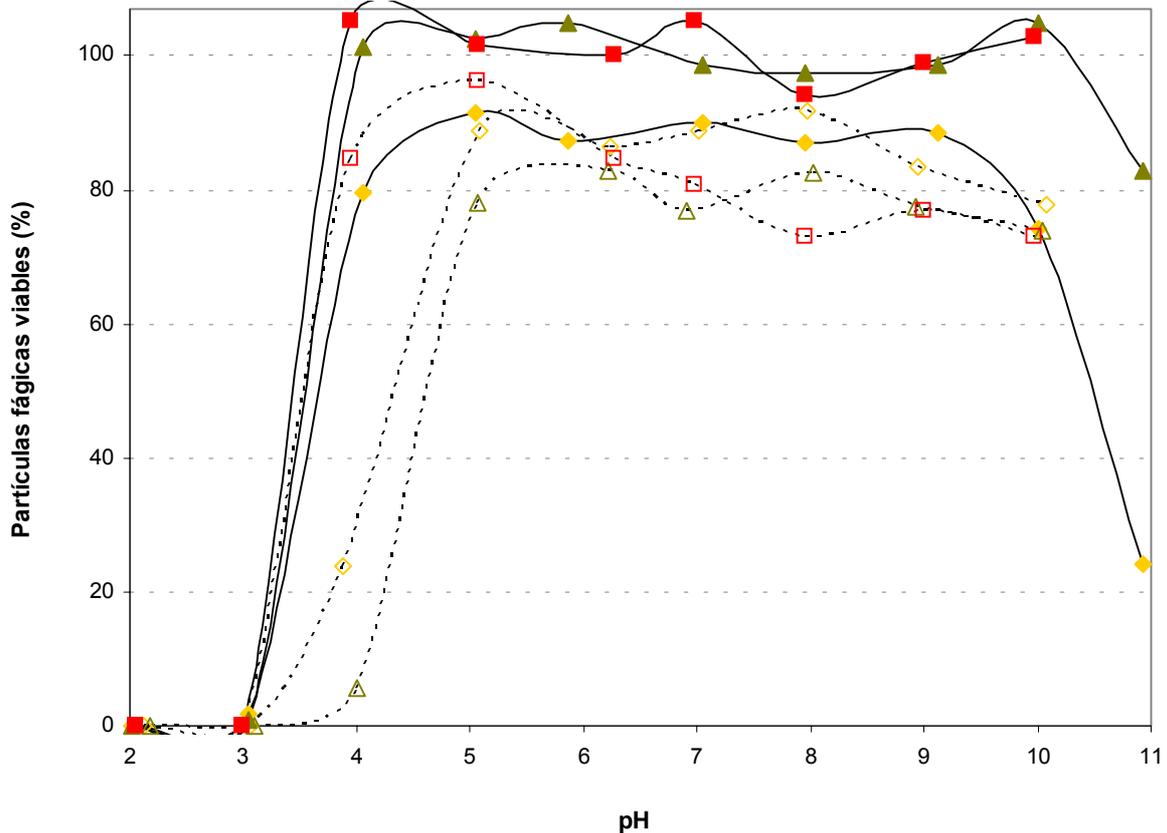
Los recuentos de partículas del fago MLC-A permanecieron sin variación por los primeros tres meses (a 4°C) o por 5 meses (a -20°C y a -80°C). Luego de tres meses a temperaturas de refrigeración, se produjo un importante descenso en el número de partículas infectivas. Hacia el final de los ensayos (19 meses), menos del 4% de partículas fágicas fueron capaces de infectar a su cepa sensible. Cuando los fagos fueron conservados por congelamiento, los títulos decayeron alrededor de un 20% entre el quinto y el séptimo mes. Luego de esta reducción inicial, los títulos fágicos permanecieron prácticamente estables por el resto de la experiencia (Fig. 16 c).

III.2.1.5 Viabilidad de los bacteriofagos a distintos valores de pH

Los fagos PL-1, J-1 y MLC-A se mostraron notablemente resistentes dentro de un rango amplio, exhibiendo elevados recuentos aún a pH relativamente extremos. Las suspensiones virales fueron inactivadas completamente luego de 30 min a pH 2, excepto para los fagos J-1 (a 37°C) y MLC-A (a 37°C y a temperatura ambiente), que a pH 3, perdieron completamente su viabilidad (Fig. 17).

Durante las experiencias realizadas a temperatura ambiente, la viabilidad de los fagos J-1 y MLC-A no se vio disminuida a valores de pH entre 4 y 10. El fago PL-1 en cambio, se mostró algo más sensible evidenciando caídas en los recuentos de partículas viables. Sin embargo, los porcentajes se mantuvieron en valores superiores a 85% en el rango de pH 5 – 9 y aún a pH extremos de 4 y 10, sobrevivieron el 79 y 74%, respectivamente, de las partículas fágicas. Su comportamiento no fue muy diferente cuando las suspensiones se incubaron a 37°C , excepto a pH 4 donde menos del 24% de las partículas permanecieron viables. Los fagos J-1 y MLC-A se vieron más afectados por los efectos combinados de pH y temperatura, manteniéndose en el primero de los casos, porcentajes cercanos al 80% entre

pH 5 y 10. Para el fago MLC-A, se observó una disminución (20 - 30%) en sus recuentos para pH 6 y superiores, pero el porcentaje de fagos infectivos a pH 4 fue extraordinariamente elevado, a comparación de los demás fagos.



III.2.1.6 Influencia de sacarosa y sales inorgánicas sobre la viabilidad de los fagos

La viabilidad de las suspensiones del fago PL-1 sólo se vio ligeramente afectada por concentraciones de sales (2%) y de sacarosa (10%) en caldo MRS (Fig. 18). El fago J-1 se mostró más sensible frente a las soluciones ensayadas, obteniéndose valores porcentuales entre 49,4 a 88,0%, siendo en general inferiores en caldo MRS. Por el contrario, la

infectividad del fago autóctono se mostró prácticamente inalterada y sólo declinó en una solución de KCl 2% en caldo MRS.

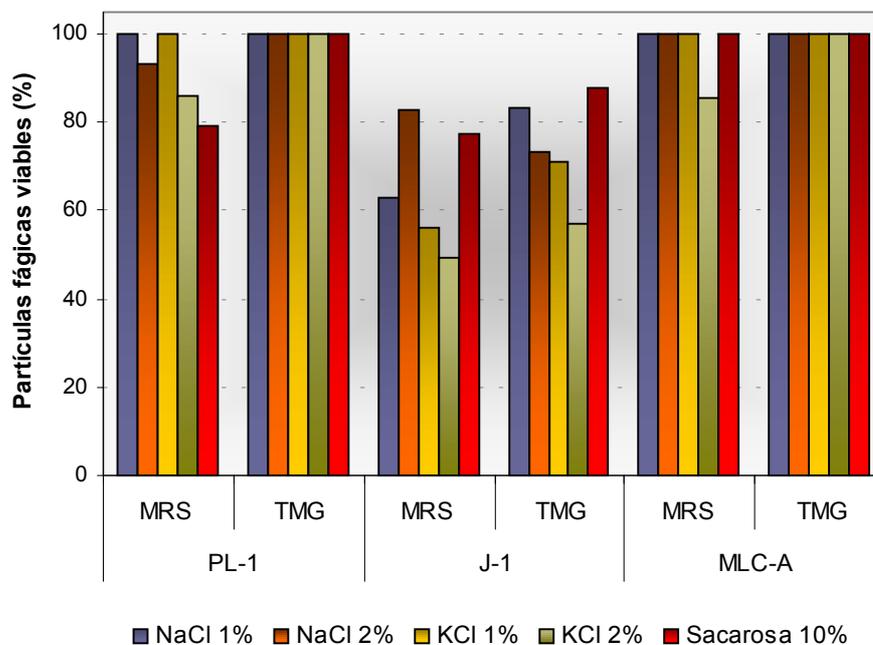


Figura 18. Viabilidad de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A en presencia de sacarosa y sales, en caldo MRS y buffer TMG (Porcentaje de partículas viables luego de 4 h a 37°C con relación a un control (caldo MRS y buffer TMG sin el agregado de solutos)). Los valores son la media de tres determinaciones.

III.2.1.7 Resistencia térmica y química

Cinéticas de muerte térmica

Se estudió la resistencia térmica de los fagos, suspendidos en diferentes medios. En general, los dos fagos de colección se comportaron de un modo similar frente a los distintos tratamientos, mientras que el fago MLC-A, aislado de una planta industrial, se mostró significativamente más termorresistente (Fig. 19).

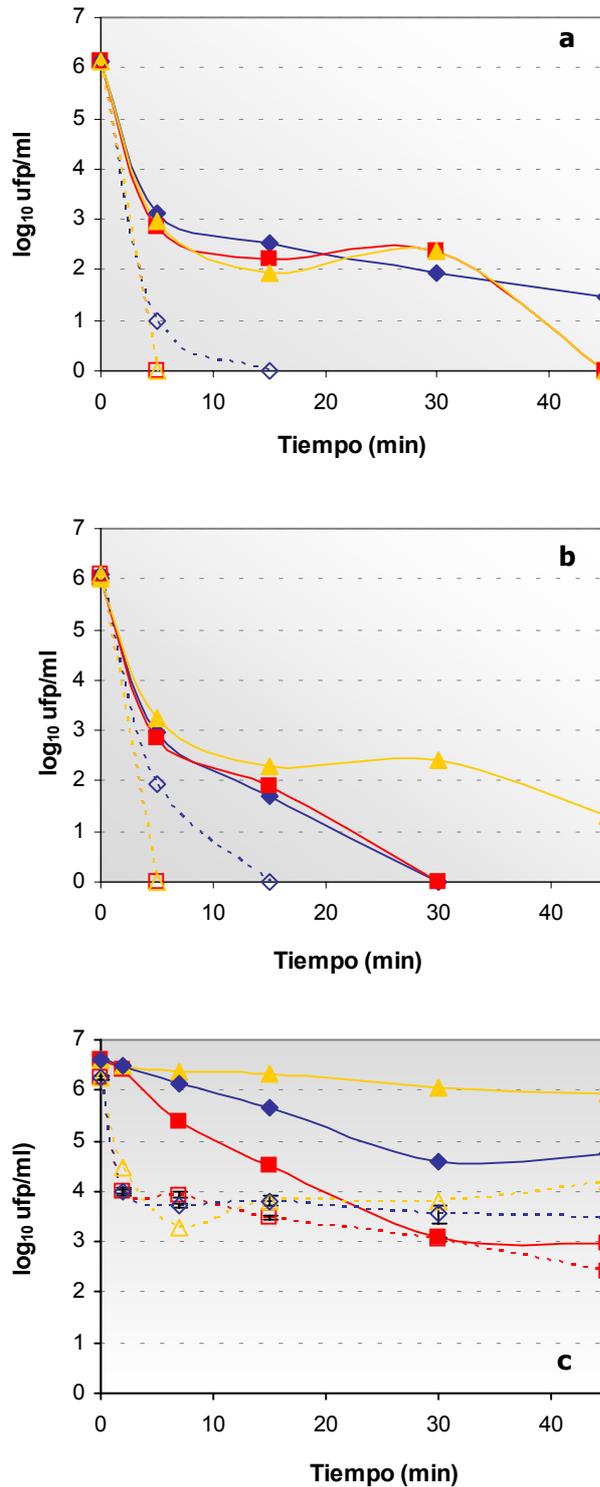


Figura 19. Cinéticas de inactivación térmica de los fagos PL-1 (a), J-1 (b) y MLC-A (c) a 63°C (—) y a 72°C (-----) en LDR (▲), buffer TMG (◆) y caldo MRS (■). Los valores son la media de tres determinaciones.

Cuando PL-1 y J-1 fueron calentados a 63 y 72°C, se detectaron importantes reducciones en el número de partículas infecciosas ($T_{99} < 5$ min), para los tres medios empleados (Tabla 9). Las curvas de inactivación térmica resultantes no siguieron una cinética de primer orden, sino que mostraron un comportamiento dual, con una caída importante en los primeros 5 min y una declinación gradual en el tiempo hasta el final de la experiencia. Los recuentos de PL-1 se redujeron en 6 órdenes logarítmicos luego de 45 min a 63°C, tanto para caldo MRS como para LDR, mientras que en buffer TMG, la caída fue menor ($4,6 \log_{10}$). Para J-1, a los 30 min de tratamiento (TMG y MRS) no se detectaron placas (<10 ufp/ml), y para LDR, la caída a los 45 min fue de $4,7 \log_{10}$. A 72°C, ambos fagos exhibieron una notable sensibilidad. Ya a los 5 min de calentamiento, en MRS y LDR, no fue posible detectar partículas infectivas, mientras que en buffer TMG se observó una resistencia térmica algo mayor.

El fago MLC-A fue capaz de sobrevivir a los tratamientos térmicos comúnmente empleados en la industria láctea. Los tratamientos a 63°C o a 72°C no fueron suficientes para inactivar completamente suspensiones fágicas de alto título (10^6 ufp/ml), aún luego de 45 min. A diferencia de lo ocurrido con los otros dos fagos estudiados, donde no fue posible encontrar diferencias entre los tres medios empleados, durante los calentamientos la LDR actuaría de un modo protectoro hacia las partículas fágicas de MLC-A. Los valores de T_{99} calculados para LDR fueron más elevados que los obtenidos para caldo MRS y buffer TMG (Tabla 9).

Tabla 9. Resistencia térmica (T_{99}) de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A en diferentes medios de suspensión. Los valores son la media de tres determinaciones.

Fago	T_{99}^*								
	MRS			LDR			TMG		
	63°C	72°C	90°C	63°C	72°C	90°C	63°C	72°C	90°C
PL-1	2.4	<5	<5	2.5	<5	<5	2.6	1.4	<5
J-1	2.5	<5	<5	3.1	<5	<5	2.8	2.1	<5
MLC-A	14.2	1.5	<2	>45	2.6	<2	30	1.5	<2

* Tiempo (min) para lograr el 99% de inactivación de partículas fágicas.

MRS: Man Rogosa Sharp; LDR: leche descremada reconstituida; buffer TMG: buffer tris-magnesio-gelatina.

Para los tres fagos, y en cualquiera de los medios ensayados, el calentamiento a 90°C fue lo suficientemente energético como para disminuir rápidamente los recuentos a valores no detectables (<10 ufp/ml).

Los fagos MLC-A3R y MLC-A12R fueron empleados para estudiar, en forma preliminar, sus resistencias térmicas. En el caso del fago MLC-A3R, si bien luego de la aplicación del tratamiento térmico a una suspensión (en caldo MRS) de alto título (10⁸ ufp/ml), se observaron disminuciones en los recuentos, el fago mostró la capacidad de soportar el calentamiento (datos no mostrados). De modo similar se comportó el fago MLC-A. Cabe destacar que para este último, caracterizado en mayor detalle, no fue posible detectar (< 10 ufp/ml) placas de lisis cuando una suspensión en caldo MRS de concentración de 10⁶ ufp/ml, se sometió a un tratamiento de 90°C por 15 min. En cambio, partiendo de una concentración más elevada (10⁸ ufp/ml), sí fue posible encontrar algunas partículas fágicas capaces de soportar el tratamiento.

Para el fago MLC-A12R, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. Si bien se produjo una reducción importante de los recuentos iniciales, luego del tratamiento térmico aplicado, el fago mostró una termorresistencia elevada, considerando que se trata de un tratamiento energético. Por otro lado, se observó un claro efecto protector del medio en el cual provienen las muestras de Tanque de Fermentación, a comparación de la leche (para pH similares).

Tabla 10. Variación en los recuentos de partículas viables del fago MLC-A12R, luego de un tratamiento térmico a 90°C - 15 min, en LDR y el medio de las muestras provenientes de Tanque de Fermentación (TF) con ajuste de pH.

Tiempo (min)	Medio			
	LDR		TF (pH corregido)	
	Título (ufp/ml)	Reducción (órdenes log ₁₀)	Título (ufp/ml)	Reducción (órdenes log ₁₀)
0	2,8.10 ⁶		2,8.10 ⁶	
15	2,0.10	5,15	8,0.10 ²	3,54
0	4,1.10 ⁸		2,9.10 ⁸	
15	8,0.10 ³	4,70	8,1.10 ⁴	3,55

Cinéticas de muerte química

Considerando los tratamientos químicos, un comportamiento similar se obtuvo para los tres fagos en presencia de los alcoholes isopropanol y etanol (Fig. 20 y 21). Para todas las concentraciones ensayadas de isopropanol, y para concentraciones de 10 y 50% de etanol, los títulos fágicos prácticamente no se afectaron y los valores de T_{99} fueron superiores a 45 min (Tabla 11). Si bien las concentraciones mayores de etanol resultaron más efectivas, no fueron suficientes para lograr la completa inactivación de los fagos, ya que aún luego de 45 min, para concentraciones de 75% (PL-1 y MLC-A) y 100% (J-1), la máxima reducción alcanzada fue de aproximadamente 3,5 órdenes logarítmicos (Fig. 21).

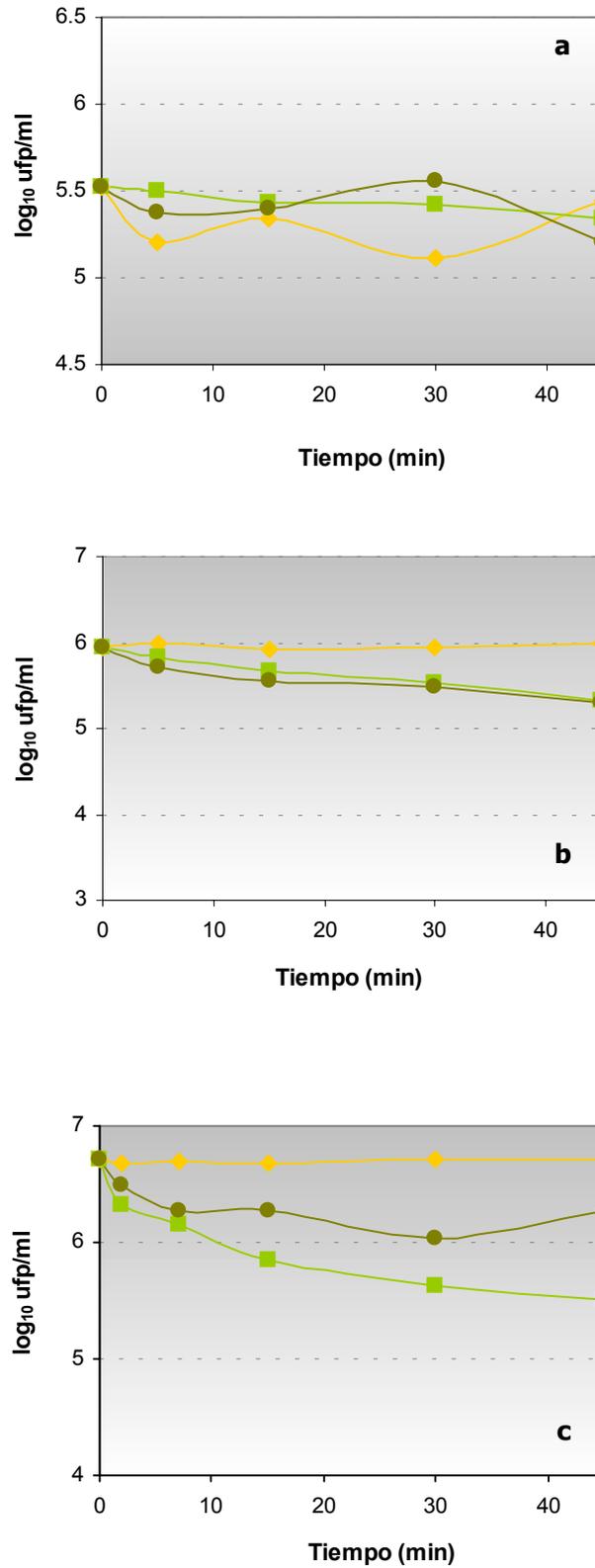


Figura 20. Cinéticas de inactivación de los fagos PL-1 (a), J-1 (b) y MLC-A (c) frente a diferentes concentraciones de isopropanol (10%, \blacklozenge ; 50%, \blacksquare ; 100%, \bullet). Los valores son la media de tres determinaciones.

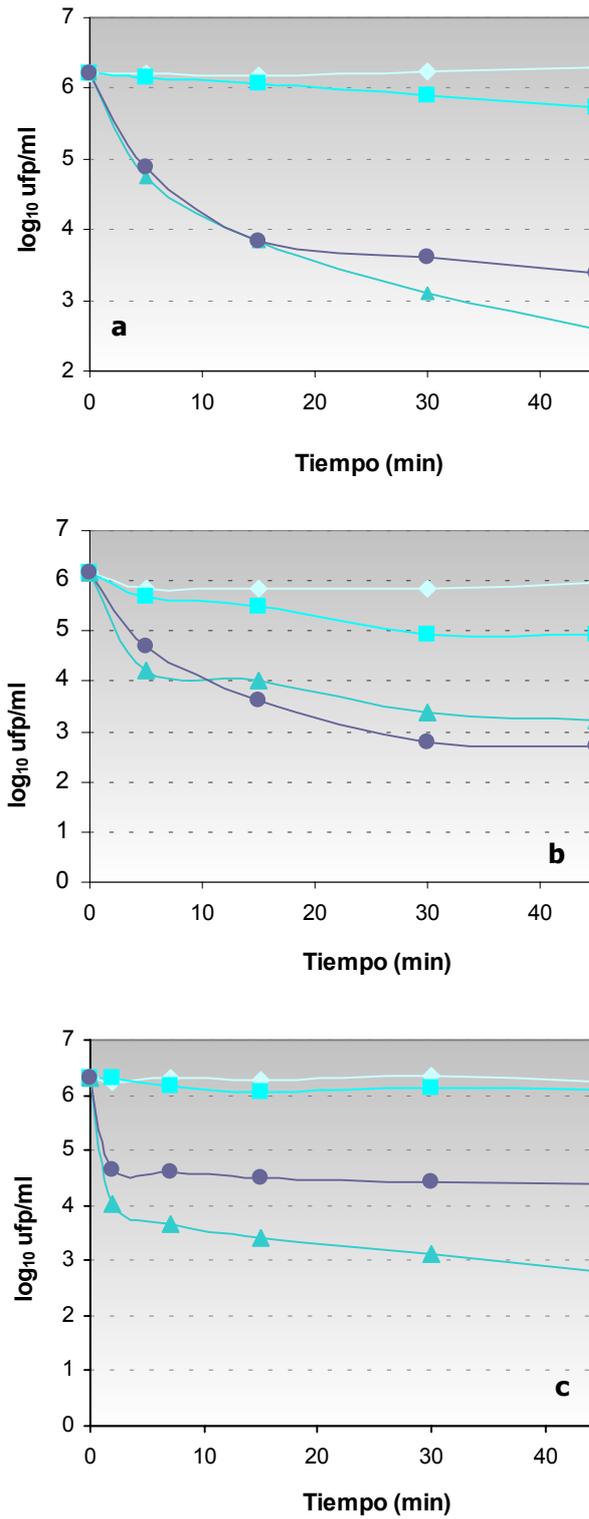


Figura 21. Cinéticas de inactivación de los fagos PL-1 (a), J-1 (b) y MLC-A (c) frente a diferentes concentraciones de etanol (10%, \diamond ; 50%, \square ; 75%, \triangle ; 100%, \bullet). Los valores son la media de tres determinaciones.

Cuando una suspensión del fago MLC-A se trató con hipoclorito de sodio (600 ppm), se logró la inactivación completa (< 10 ufp/ml) luego de 30 min de contacto ($T_{99} = 1,9$ min). Para esa concentración, los T_{99} de los fagos de colección fueron 14,8 (PL-1) y 9,0 min (J-1) (Tabla 11), mostrándose notablemente más resistentes frente a este oxidante. Luego de un tratamiento de 45 min a 700 ppm, las suspensiones de PL-1 y J-1 sufrieron reducciones de 4,8 y 5,0 órdenes logarítmicos, respectivamente, y recién frente a 800 ppm de hipoclorito de sodio sus recuentos fueron menores a 10 ufp/ml (no detectables), con 5 min de exposición al biocida (Fig. 22).

Para los tres fagos, el agente químico probado más efectivo fue el ácido peracético (0,15%), el cual logró inactivar completa (<10 ufp/ml) y rápidamente las partículas virales infectivas (Tabla 11).

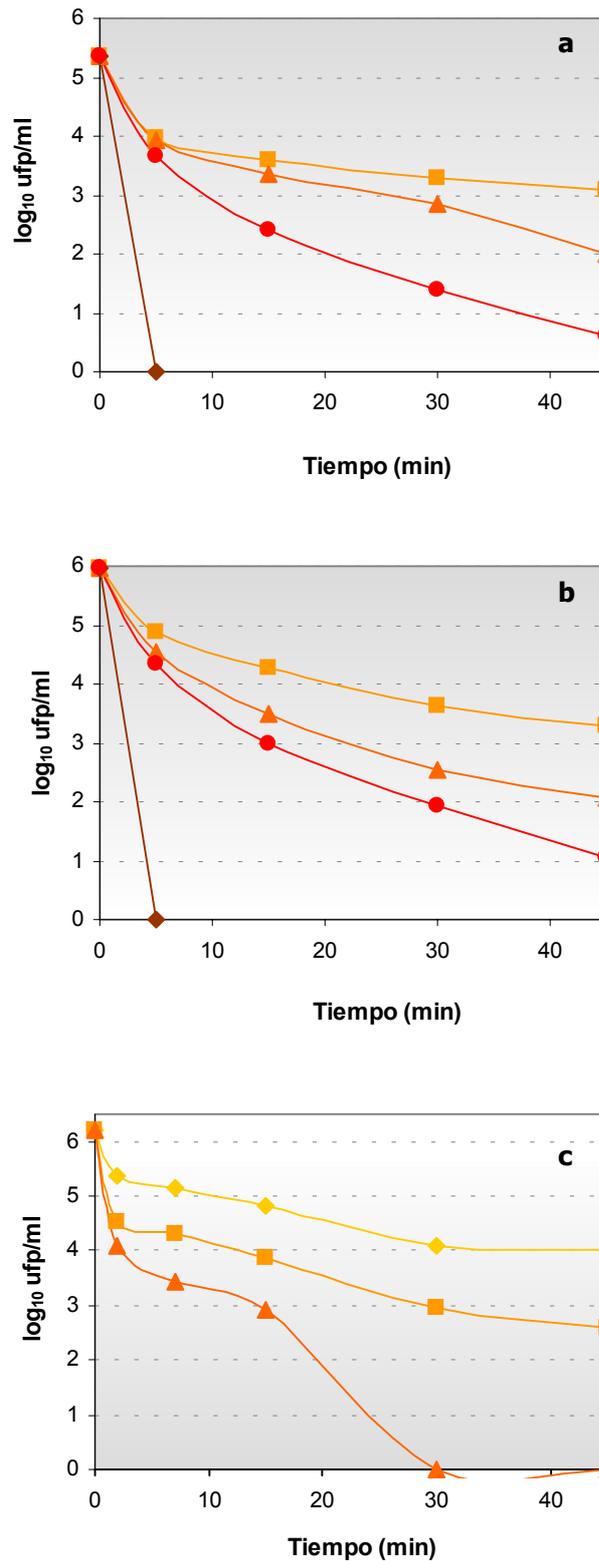


Figura 22. Cinéticas de inactivación de los fagos PL-1 (a), J-1 (b) y MLC-A (c) frente a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (200 ppm, ◆; 400 ppm, ■; 600 ppm, ▲; 700 ppm, ●; 800 ppm, ◆). Los valores son la media de tres determinaciones.

Tabla 11. Resistencia (T_{99}) de fagos de *Lb. casei* y *Lb. paracasei* a etanol, isopropanol, hipoclorito de sodio y ácido peracético. Los valores son la media de tres determinaciones.

Fago	T_{99}^*												
	Etanol (% v/v)				Isopropanol (% v/v)			Hipoclorito de sodio (ppm)				Acido peracético (% v/v)	
	10	50	75	100	10	50	100	200	400	600	700	800	0,15
PL-1	>45	>45	9.7	10.3	>45	>45	>45		26.8	14.8	6.9	<5	<5
J-1	>45	>45	5.5	9.0	>45	>45	>45		20.6	9.0	7.0	<5	<5
MLC-A	>45	>45	1.8	>45	>45	>45	>45	27.8	9.2	1.9			<2

* Tiempo (min) para lograr 99% de inactivación de las partículas fágicas.

III.2.2 Interacción de *Lactobacillus casei* / *paracasei* con sus fagos específicos

III.2.2.1 Influencia de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} en el ciclo lítico de los fagos

La lisis del cultivo en caldo MRS en ausencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} se produjo para los fagos PL-1 y J-1, más tardíamente que en presencia de alguno de los dos cationes. Comparando la velocidad de lisis entre ambos cationes y para cada uno de los fagos, la ocurrencia se logró en forma prácticamente simultánea. En forma similar, no se observó influencia del calcio en el caso del fago $\phi 393/A2$, lítico sobre la cepa *Lb. casei* ATCC 393, cuando se comparó con un control sin calcio.

El fago PL-1 produjo placas de lisis visibles aunque difusas, con un diámetro de 0,4 - 0,6 mm, sólo en presencia de calcio (Fig. 23). En cuanto al comportamiento en medio agarizado, el fago J-1 en presencia de iones calcio produjo placas de lisis muy nítidas, de 0,8 - 1,0 mm de diámetro, mientras que en su ausencia, las placas resultaron difusas y más pequeñas, con una disminución en aproximadamente 2 órdenes logarítmicos (\log_{10}) del título (Fig. 24). No se observaron cambios en la morfología de las placas cuando se utilizó magnesio en lugar de calcio, para ninguno de los dos fagos. En cambio, los títulos en presencia de magnesio cayeron en 1,1 y 0,5 órdenes logarítmicos para PL-1 y J-1, respectivamente, si se comparan con los obtenidos en presencia de calcio (datos no mostrados).

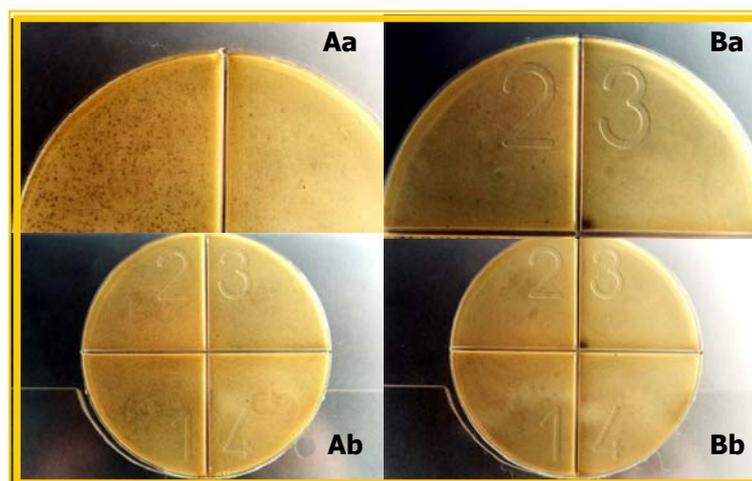


Figura 23. Placas de lisis del fago PL-1 obtenidas sobre *Lb. paracasei* ATCC 27092 (A) y *Lb. paracasei* A (B), en presencia (a) y ausencia de iones calcio (b).

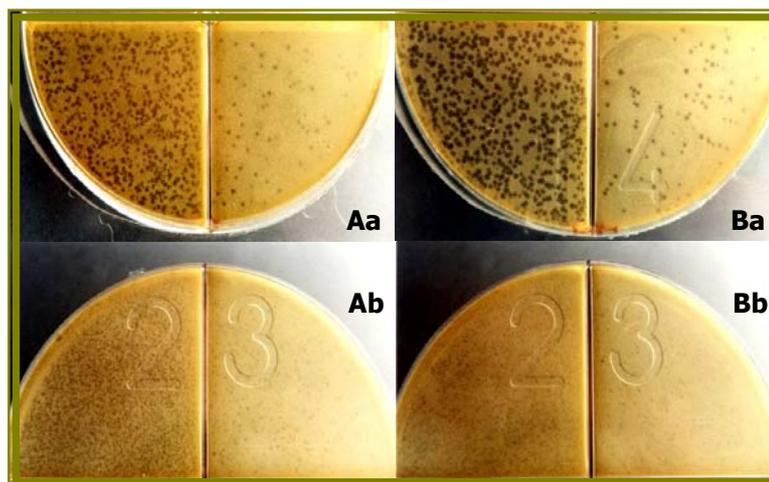


Figura 24. Placas de lisis del fago J-1 obtenidas sobre *Lb. casei* ATCC 27139 (A) y *Lb. paracasei* A (B), en presencia (a) y ausencia de iones calcio (b).

La influencia del calcio en el ciclo de los fagos de colección para medio líquido y agarizado, también se evaluó para las cepas *Lb. paracasei* A, *Lb. paracasei* Yk, *Lb. paracasei* Hn, *Lb. paracasei* Dn, *Lb. paracasei* A13 y *Lb. paracasei* A14. En general se encontró que si bien la lisis se produce aún en ausencia del catión, en su presencia ocurre más velozmente. Por otro lado, el fago J-1 lisa a las cepas comerciales en caldo MRS-Ca más rápidamente que el fago PL-1 en ausencia del ión. En cuanto a medio agarizado, para el fago PL-1 los recuentos decaen un orden logarítmico cuando se realizan sobre las cepas comerciales en comparación al título obtenido sobre su cepa madre sensible (*Lb. paracasei* ATCC 27092), para caldo MRS-Ca. Sin el catión, no se observaron placas (<10 ufp/ml) sobre ninguna cepa. En el caso de J-1, los recuentos fueron idénticos para todas las cepas ensayadas, y en ausencia de calcio, sucedió lo mismo que sobre su cepa madre (*Lb. casei* ATCC 27139): disminuyeron los recuentos y cambió la morfología de las placas (datos no mostrados).

En estos ensayos el fago autóctono MLC-A, que se estudió sólo sobre *Lb. paracasei* A, se comportó de modo diferencial respecto de los fagos de colección. Los cationes divalentes fueron necesarios para producir la lisis del cultivo infectado en caldo MRS y la formación de placas visibles en medio agarizado. Tanto los iones magnesio como los de calcio fueron igualmente eficientes causando lisis en medio líquido. En cambio, para el primer catión se observaron placas con bordes difusos y menores recuentos (en un orden logarítmico) a

comparación del calcio, en presencia del cual, las placas de lisis fueron nítidas, circulares y con un diámetro de 0,8 – 1,2 mm (Fig. 25).

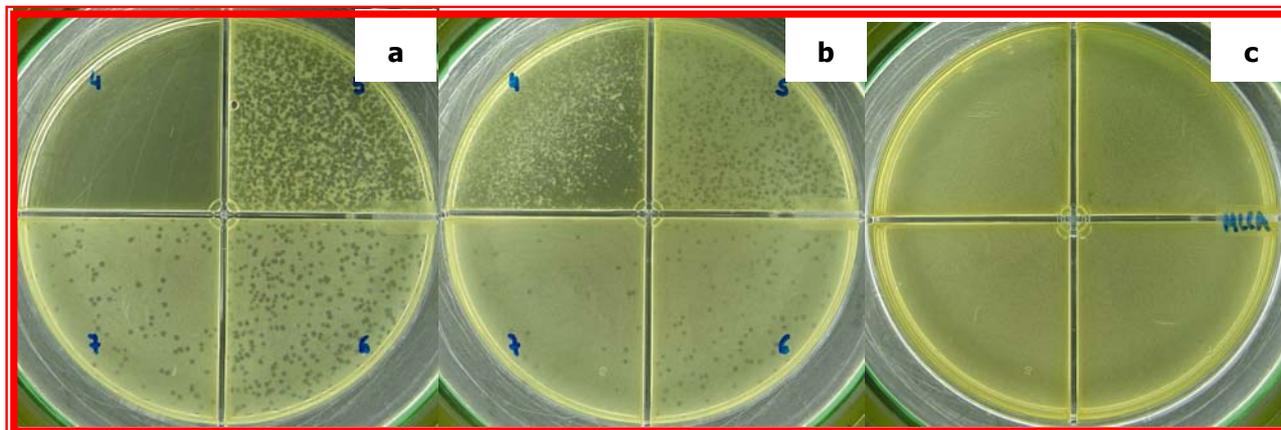


Figura 25. Placas de lisis del fago MLC-A obtenidas sobre *Lb. paracasei* A, en presencia de calcio (a), magnesio (b) y ausencia de tales cationes (c).

III.2.2.2 Determinación del espectro de huéspedes

Para investigar el rango de hospedadores de los fagos de colección, el fago $\phi 393/A2$, y ciertos fagos salvajes originarios de procesos industriales, que resultaron diferentes según los perfiles de restricción obtenidos, se emplearon 47 cepas de *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. gasserii*, provenientes de diversos orígenes (de colección, comerciales y salvajes).

Como puede observarse en la Tabla 12, todos los fagos estudiados mostraron un espectro de cepas sensibles idéntico y en general, produjeron la lisis de los cultivos en medio líquido durante el primer repique de sensibilidad, o a lo sumo tempranamente en un segundo repique. En forma consistente con esta última observación, los resultados obtenidos con el Spot Test, fueron completamente coincidentes con los de Test de Turbidez. De los 7 casos de lisis en el segundo repique, todos se produjeron sobre cepas comerciales y 5 correspondieron al fago PL-1.

Tabla 12. Rango de huéspedes de fagos específicos de *Lb. casei* y *Lb. paracasei*

Organismo	Cepa	Sensibilidad frente a los fagos ²						
		PL-1	J-1	A2	MLC-A	MLC-A2	MLC-A6	MLC-A7R
<i>Lactobacillus casei</i>	CNRZ 1874	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-
	M	-	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-
	81	-	-	-	-	-	-	-
	84	-	-	-	-	-	-	-
	85	-	-	-	-	-	-	-
	86	-	-	-	-	-	-	-
	88	-	-	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-	-	-
	SA	-	-	-	-	-	-	-
	ATCC 27139	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 393	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	ATCC 27092	+	+	+	+	+	+	+
	Yk	+(2°)	+	+	+	+	+	+
	Hn	+(2°)	+	+(2°)	+	+	+	+
	Dn	+(2°)	+	+	+	+	+	+
	A	+	+	+	+	+	+	+
	A13	+(2°)	+	+	+	+	+	+
	A14	+(2°)	+	+(2°)	+	+	+	+
	Bio	-	-	-	-	-	-	-
	L26	-	-	-	-	-	-	-
	SA	-	-	-	-	-	-	-
	CNRZ 1224	-	-	-	-	-	-	-
	CNRZ 1308	-	-	-	-	-	-	-
	CNRZ 318	-	-	-	-	-	-	-
	CNRZ 1976	-	-	-	-	-	-	-
	PR	-	-	-	-	-	-	-
JP1	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	F37	-	-	-	-	-	-	-
	F37"	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG	-	-	-	-	-	-	-
	A15	-	-	-	-	-	-	-
	A16	-	-	-	-	-	-	-
	F22	-	-	-	-	-	-	-
	F30	-	-	-	-	-	-	-
	F49	-	-	-	-	-	-	-
	F53	-	-	-	-	-	-	-
	F56	-	-	-	-	-	-	-
	F70	-	-	-	-	-	-	-
	F74	-	-	-	-	-	-	-
	F85	-	-	-	-	-	-	-
	F95	-	-	-	-	-	-	-
	73	-	-	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	-	-	-	-
	77	-	-	-	-	-	-	-
	78	-	-	-	-	-	-	-

² + sensible; - resistente; según Test de Turbidez (n° repique, si la lisis no se produjo en primer repique) y Spot Test.

De las 16 cepas de *Lb. paracasei* empleadas, 7 resultaron sensibles a los fagos; mientras que para *Lb. casei*, sólo 2 de las 13 cepas lo fueron. Estos resultados podrían indicar que estos fagos, si bien son capaces de infectar ambas especies, parecen ser más específicos para *Lb. paracasei*. Por otro lado, todas las cepas ensayadas de *Lb. rhamnosus* y *Lb. gasseri* fueron insensibles frente a los siete fagos empleados.

III.2.2.3 Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus casei* / *paracasei* en caldo MRS.

Influencia del calcio y de la dosis infectiva

Para cada sistema conformado se estudió la influencia del calcio y de diferentes dosis de fagos, sobre las cinéticas de crecimiento en caldo MRS, monitoreando la evolución mediante mediciones de Absorbancia a una longitud de onda adecuada (Fig. 26).

Para todos los sistemas evaluados se observó que a igualdad de dosis infectiva, la lisis de los cultivos se produjo más rápidamente cuando el Ca^{2+} estuvo presente en el medio. Para los m.o.i. más elevados, también se evidenciaron retardos en las curvas de crecimiento en ausencia de calcio, con relación a un control con calcio y sin fagos (Fig. 26 a, b, c y d). Además, para los casos de mayor concentración de fagos y en presencia de calcio, los cultivos fueron prácticamente incapaces de desarrollar, mostrando valores de $A_{560\text{nm}}$ menores a los iniciales, entre 2 y 4 hs de transcurridas las experiencias. El sistema PL-1 / *Lb. paracasei* A fue la excepción, ya que recién a las 5,5 hs la $A_{560\text{nm}}$ igualó las mediciones a tiempo cero. Este sistema también mostró lisis tardías durante las experiencias en medio líquido de los Tests de Turbidez.

El fago MLC-A en presencia de calcio, logró lisar rápidamente (aproximadamente en 5 hs) al cultivo de *Lb. paracasei* A, al m.o.i. más bajo evaluado (0,003). Sin embargo, en ausencia del catión, el crecimiento de la cepa no se vio modificado por los fagos presentes, para ninguna de las dosis ensayadas (Fig. 26 e).

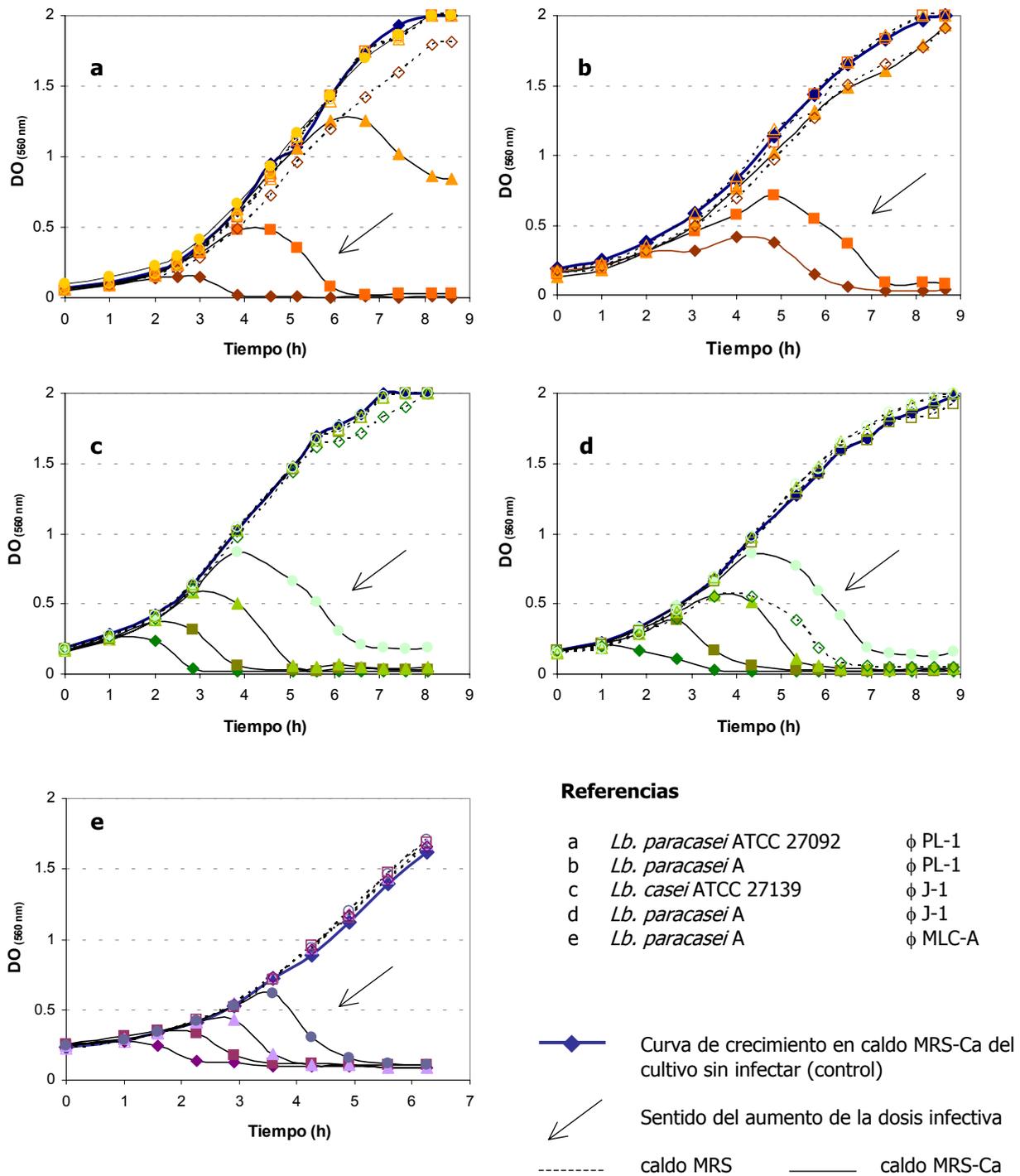


Figura 26. Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus casei*/*paracasei*. Influencia del calcio y la dosis infectiva fágica

III.2.2.4 Ciclos de multiplicación fágica (*Burst size*)

Los parámetros de multiplicación fágica de los ciclos líticos de los fagos, fueron calculados a partir de las curvas de crecimiento en un paso (Fig. 27). Como puede observarse en la Tabla 13, tales parámetros son dependientes tanto de la cepa como del fago.

Cabe aclarar en el caso del sistema ϕ PL-1/*Lb. paracasei* A y debido al comportamiento peculiar del mismo, que si bien los parámetros obtenidos se encuentran consignados en la Tabla 13, la explicación detallada del camino seguido para lograr su determinación se encuentra en la Sección III.2.3.2.2.

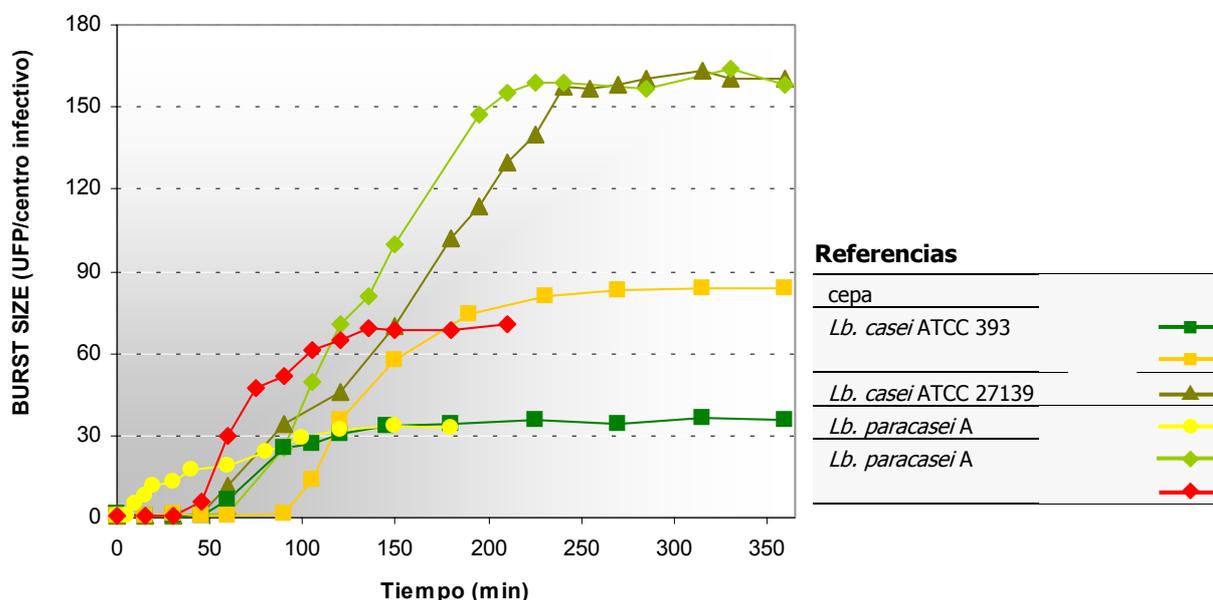


Figura 27. Curvas de crecimiento en un paso para fagos de *Lactobacillus casei* / *paracasei*. Los valores son la media de tres determinaciones.

Tabla 13. Parámetros de multiplicación de fagos de *Lactobacillus casei* / *paracasei*

Sistema fago/cepa	Período de latencia (min)	Tiempo de <i>burst</i> (min)	<i>Burst size</i> (ufp / centro de infección)
ϕ J-1/ATCC 27139	45	240	160
ϕ J-1/A	60	225	160
ϕ J-1/ATCC 393	45	145	35
ϕ PL-1/ATCC 393	90	230	80
ϕ PL-1/A	5	120	32
ϕ MLC-A/A	30	135	69

III.2.3 Caracterización de la adsorción

Se estudió el efecto de diversos parámetros fisicoquímicos en el proceso de adsorción fágica, sobre 7 sistemas fago / cepa conformados por combinaciones entre las especies disponibles.

A continuación se evalúan los resultados obtenidos para 6 de esos sistemas, mientras que nuevamente el sistema ϕ PL-1 / *Lb. paracasei* A, merece un análisis más detallado que se aborda en la Sección III.2.3.2.1.

III.2.3.1.1 Influencia del calcio

Como se observa en general en la Fig. 28a, el calcio no tuvo una influencia significativa ($P > 0.05$) sobre la adsorción de los fagos. Luego de 5 min de incubación, más del 98% de las partículas fágicas de J-1 y de PL-1, fueron adsorbidas sobre las cepas *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. casei* ATCC 393, respectivamente. Para estos sistemas, los máximos valores (99,1 – 99,9%) se alcanzaron entre 15 – 45 min en caldo MRS, tanto en presencia como en ausencia de iones calcio. El fago J-1 mostró aproximadamente 90% de adsorción sobre *Lb. paracasei* A y *Lb. casei* ATCC 393 a los 15 min, mientras que los máximos valores (94 – 97,9%) se presentaron a 30 – 45 min de iniciadas las experiencias. Tampoco la adsorción del fago MLC-A sobre la cepa de colección *Lb. casei* ATCC 27139 fue dependiente del Ca^{2+} , con adsorciones de 92 – 95% y de 99,5% a los 5 y 45 min de incubación, respectivamente.

Un comportamiento fuera de los patrones observados ocurrió para el fago MLC-A y la cepa *Lb. paracasei* A, siendo éste el único sistema sobre el cual la influencia del calcio en el medio fue significativa ($P < 0.01$) sobre las cinéticas de adsorción. Porcentajes máximos de aproximadamente 95% se alcanzaron luego de 15 min de incubación en presencia del catión. En cambio, en su ausencia sólo el 37% de las partículas fágicas logró adsorberse aún luego de 45 min.

III.2.3.1.2 Influencia de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la adsorción fue altamente dependiente del sistema fago / cepa, aunque en todos los casos se verificó para todo el rango de temperaturas estudiadas (Fig. 28b). Los porcentajes obtenidos luego de 30 min de incubación, oscilaron entre 57 y 99,8 a 0°C. Los máximos porcentajes de adsorción para el fago J-1 se alcanzaron a 30°C sobre todas sus cepas sensibles. Estos valores se mantuvieron hasta 50°C (*Lb. casei* ATCC 27139) y decayeron a 77,6% (*Lb. paracasei* A) y 88% (*Lb. casei* ATCC 393) a 45 – 50°C. Por el contrario, en el caso del fago PL-1 sobre *Lb. casei* ATCC 393, la adsorción fue totalmente independiente de la temperatura.

Para el fago MLC-A, tanto en su adsorción sobre *Lb. paracasei* A como sobre *Lb. casei* ATCC 27139, los valores se mantuvieron prácticamente constantes en el rango de temperaturas entre 10 y 45°C. En el primer caso se lograron adsorciones de 89- 95%, y fueron mayores (96 – 99%) sobre la cepa de colección. Para las temperaturas más extremas, se tuvieron disminuciones leves para *Lb. casei* ATCC 27139, mientras que cayeron a 59 (0°C) y 78% (50°C), para el otro sistema. Estos valores son prácticamente idénticos a los que se vieron (a las mismas temperaturas) para el fago J-1, notablemente sobre la misma cepa *Lb. paracasei* A.

Un ensayo realizado para evaluar la viabilidad del fago J-1 a las temperaturas de 45 y 50°C durante 30 minutos de incubación, descartó la posibilidad de que los valores bajos de adsorción fueran consecuencia de la inactivación de las partículas de J-1 por el calentamiento.

III.2.3.1.3 Influencia de un tratamiento térmico sobre las células

Las tasas de adsorción fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) cuando se determinaron en células a las cuales se les aplicó un tratamiento térmico que ocasionó la pérdida de viabilidad de las mismas, o sobre células sin tratar (viables) (Fig. 28c). Para todos

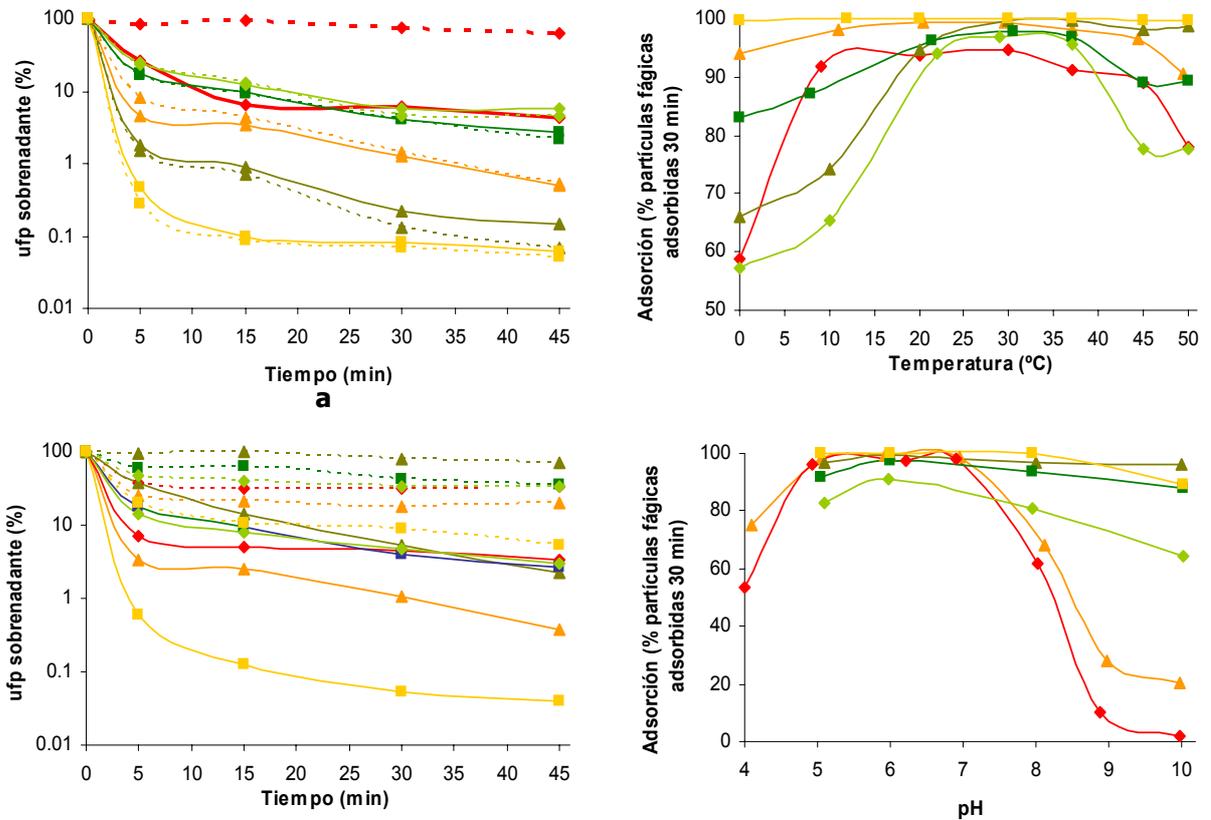
los sistemas ensayados y ya a partir de los 5 min de incubación, se obtuvieron diferencias en los porcentajes de adsorción sobre células viables y no viables, entre 19,2 y 57,1%.

III.2.3.1.4 Influencia del pH

En general, para todos los fagos, las tasas más elevadas de adsorción (91,3 – 99,9%) se obtuvieron entre pH 5 y 7. Sin embargo, el efecto de este parámetro sobre el primer paso del ciclo fágico, fue dependiente del sistema considerado (Fig. 28d).

Algunos sistemas mostraron elevados porcentajes (90 – 100%) de adsorción dentro de todo el rango estudiado, indicando una leve afectación frente al pH. Para el fago J-1 y *Lb. paracasei* A, se observaron disminuciones a valores de alrededor de 80% para pH 5 y 8, y de hasta 64 % para pH 10. Para el fago MLC-A en cambio, la adsorción fágica fue fuertemente afectada por el pH del medio, tanto para *Lb. paracasei* A como para *Lb. casei* ATCC 27139. Elevados porcentajes resultaron de las adsorciones de este fago con ambas cepas a valores de pH entre 5 y 7, sin embargo se produjeron disminuciones a pH 4 y 8 y las mismas se hicieron muy notables por encima de pH 9 (inferiores al 30%).

Para el caso de la cepa *Lb. paracasei* A, y debido a que con los dos fagos con los que se estudió las adsorciones disminuyeron a valores de pH extremos, se realizaron controles de viabilidad para descartar que fuera la cepa la afectada y no la adsorción en sí. Se comprobó que esta etapa era la influenciada a valores de pH extremos, ya que los recuentos celulares no se vieron afectados dentro del rango de pH en estudio.



Referencias

cepa	fago	
<i>Lb. casei</i> ATCC 393	J-1	—■—
	PL-1	—■—
<i>Lb. casei</i> ATCC 27139	J-1	—▲—
	MLC-A	—▲—
<i>Lb. paracasei</i> A	J-1	—◆—
	MLC-A	—◆—

Figura 28. Efecto de parámetros fisicoquímicos en la adsorción de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A sobre células de *Lactobacillus casei/paracasei*. **a)** Influencia del ion calcio en caldo MRS, con (—) y sin (-----) Ca^{2+} (10 mM). **b)** Influencia de la temperatura (luego de 30 min), en caldo MRS-Ca. **c)** Influencia del pH, en caldo MRS-Ca. **d)** Influencia de un tratamiento térmico sobre las células, en caldo MRS-Ca – células viables () y no-viables (-----). Los valores son la media de tres determinaciones.

III.2.3.2 Interacción entre *Lactobacillus paracasei* A y el fago de colección PL-1

III.2.3.2.1 Adsorción

Este sistema se comportó de un modo muy particular, en comparación a los otros sistemas estudiados. Si bien el fago es capaz de producir placas de lisis sobre esta cepa y la misma resulta sensible tardíamente en un primer repique o tempranamente en segundo repique, la adsorción resultó nula cuando se determinó en ensayos típicos de 30 – 45 min. Se determinó asimismo la adsorción de este fago sobre otras cepas comerciales (*Lb. paracasei* Yk, *Lb. paracasei* Hn, *Lb. paracasei* A14) cuyos cultivos, al igual que *Lb. paracasei* A, lisan al final del 1° repique de sensibilidad. Para estos casos, los porcentajes de adsorción a los 45 min resultaron también prácticamente nulos (datos no mostrados).

En razón de estos resultados, se decidió llevar a cabo una experiencia de adsorción por un período de tiempo muy prolongado (9 hs), evaluando sólo en MRS-Ca, debido a que en la presencia de este catión, la lisis del cultivo ocurre más velozmente. La cinética de adsorción obtenida (Fig. 29) presentó una forma atípica, comparándola con las obtenidas para los otros sistemas ensayados durante 45 min. Como se observa, los máximos porcentajes de adsorción (90 – 99 %) se lograron con una incubación prolongada de los cultivos infectados (4 – 6 hs), es decir que la adsorción resulta muy lenta para este sistema.

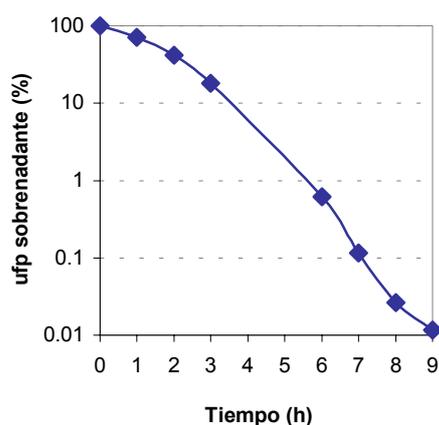


Figura 29. Cinética de adsorción del fago PL-1 sobre *Lactobacillus paracasei* A, en caldo MRS adicionado con calcio 10 mM. Los valores son la media de tres determinaciones.

Sin embargo, fue observado que durante estas incubaciones prolongadas en caldo MRS, las células se multiplicaban, con lo cual los pellets recogidos por centrifugación para determinar los fagos libres en el sobrenadante, fueron aumentando su volumen con el transcurrir del tiempo. El problema reside en que si el cultivo continúa creciendo, como puede observarse más adelante en la Fig. 33 para caldo MRS, las condiciones fijadas para las experiencias resultan modificadas permanentemente a lo largo de las mismas, imposibilitándose de ese modo la obtención de resultados precisos.

Por otra parte, si la experiencia de adsorción resulta más larga que el ciclo de multiplicación fágica, al titular fagos libres en el sobrenadante, no sólo se estarían titulando los fagos iniciales no adsorbidos, sino también los fagos originados en la propagación.

Esta situación hizo imprescindible el reemplazo del caldo MRS por un medio no proliferativo, de modo de evitar el crecimiento del cultivo, pero sin afectar su viabilidad. Así, se impediría el desarrollo de la célula y por consiguiente la multiplicación fágica. Para ello, se empleó buffer TMG en los ensayos de adsorción y posteriormente, también durante los ensayos de crecimiento en un paso (*burst size*). Los recuentos de suspensión de células en buffer TMG mostraron ausencia de propagación respecto de caldo MRS, aunque sin pérdida de viabilidad (datos no mostrados).

En los experimentos de adsorción en buffer TMG, se titularon los fagos libres en el sobrenadante a lo largo de 9 hs (Fig. 30). La adsorción se produjo tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} . En ausencia del catión, la tasa de adsorción resultó más elevada, aunque finalmente se lograron máximos de 99,9 % para ambas condiciones a partir de las 6 hs de incubación.

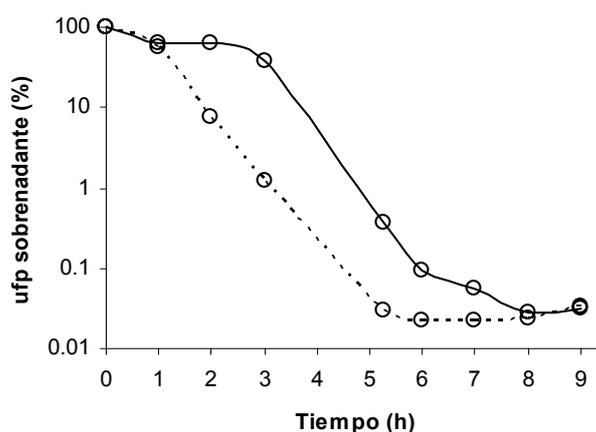


Figura 30. Influencia de los iones calcio en la cinética de adsorción del fago PL-1 sobre *Lactobacillus paracasei* A, en buffer TMG con (—) y sin (---) Ca^{2+} 10 mM. Los valores son la media de tres determinaciones.

El estudio del efecto del tratamiento térmico aplicado a las células de *Lb. paracasei* A mostró una marcada influencia en la adsorción del fago PL-1 (Fig. 31). La tasa de adsorción sobre células tratadas no superó el 60 %, mientras que las células no sometidas a calentamiento, mostraron valores de adsorción de 99,9 % a partir de la quinta hora de incubación del cultivo infectado.

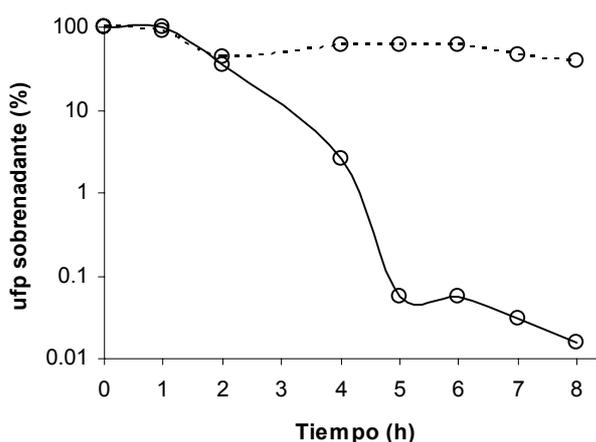


Figura 31. Influencia de un tratamiento térmico aplicado sobre las células de *Lactobacillus paracasei* A, en las cinéticas de adsorción del fago PL-1, en buffer TMG sobre células viables (—) y no viables (---). Los valores son la media de tres determinaciones.

En cuanto a la influencia de las temperaturas de incubación en la tasa de adsorción, para este sistema se obtuvieron máximos porcentajes (99,9%) a 37°C, mientras que sólo el 85,6% de las partículas virales fueron adsorbidas a 30°C. No se obtuvieron placas visibles a 45°C y 50°C, sugiriendo pérdida de viabilidad fágica a esas temperaturas (Fig. 32). En un ensayo posterior se comprobó que la incubación de los viriones por 6 hs a estos últimos valores de temperatura, causa una reducción en los recuentos fágicos por pérdida de viabilidad (datos no mostrados).

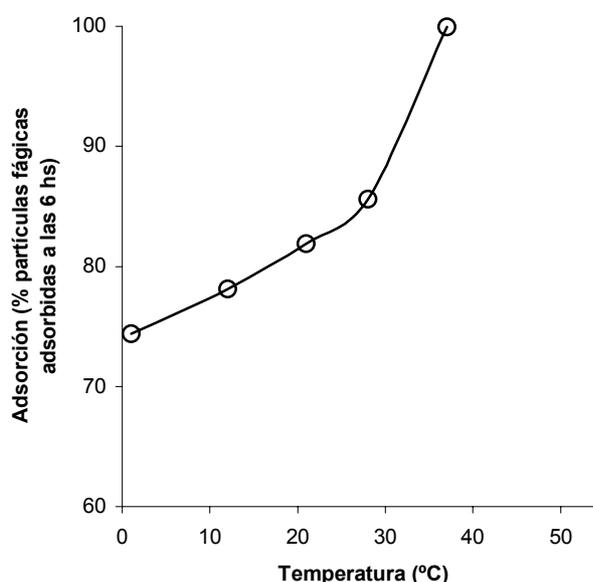


Figura 32. Influencia de la temperatura en la adsorción del fago PL-1 sobre *Lactobacillus paracasei* A (luego de 6 hs) en buffer TMG-Ca. Los valores son la media de tres determinaciones.

III.2.3.2.2 Curvas de crecimiento en un paso

Para las experiencias de crecimiento en un paso (*burst size*), se consideró a la adsorción como la etapa lenta para este sistema, por lo que la misma se llevó a cabo en buffer TMG por 4,5 hs. Se supuso que las etapas posteriores a la adsorción ocurrirían con un comportamiento típico, similar a los restantes sistemas estudiados, por lo que luego se prosiguió en caldo MRS-Ca para garantizar que las células se encuentren metabólicamente activas en un medio con nutrientes disponibles, necesario para que ocurran las etapas intracelulares del ciclo fágico.

Se comprobó que las células no sólo no perdían viabilidad en el buffer TMG sino que, además, no sufrían una fase de readaptación al caldo MRS ya que inmediatamente comenzaron a multiplicarse logrando, a las 9 hs de incubación finales, casi alcanzar la concentración máxima del cultivo desarrollado exclusivamente en MRS. Incluso se observó que las velocidades de crecimiento (pendiente de la curva), en ambos casos, fueron similares (Fig. 33).

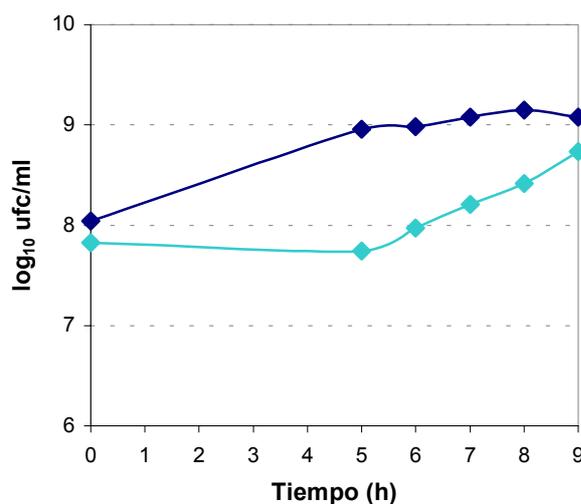


Figura 33. Cinéticas de crecimiento de un cultivo de *Lactobacillus paracasei* A desarrollado exclusiva (◆) y parcialmente (◆) en caldo MRS, con una incubación previa en buffer TMG. Los valores son la media de tres determinaciones.

La determinación aproximada de los parámetros de multiplicación fágica para este sistema, se logró para un m.o.i. = 2. No se detectó un período de latencia y la curva obtenida (Fig. 34) muestra la ocurrencia de un ciclo corto, con un tiempo de latencia de 5 min y un *burst time* de 120 min. El *burst size* resulta de aproximadamente 35 ufp / centro infectivo.

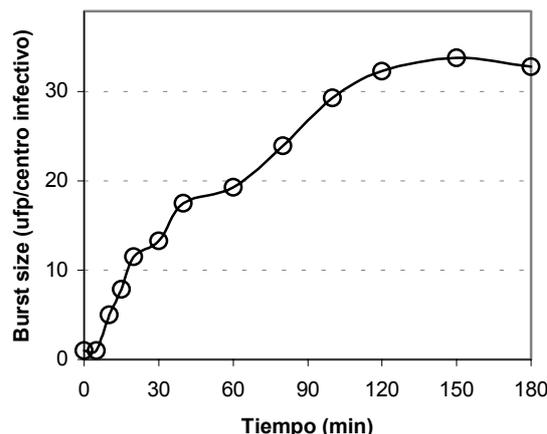


Figura 34. Curva de crecimiento en un paso del fago PL-1 sobre *Lactobacillus paracasei* A, a una dosis infectiva (m.o.i.) de 2. Los valores graficados son la media de tres determinaciones.

Debido a la complejidad del análisis de este sistema, los parámetros obtenidos son estimativos. Probablemente los mayores errores se encuentren en la determinación del período de latencia, ya que resulta poco probable que sea tan corto. Ocurre que, si bien la célula es incubada con el fago en TMG durante la adsorción, el pasaje desde caldo MRS al buffer es inmediatamente previo a la infección. Esto hace que la célula, aunque se encuentre en un medio no proliferativo y sin nutrientes, disponga de algún contenido energético como para soportar el inicio del ciclo fágico intracelular. Agotada toda su energía, el ciclo quedaría detenido hasta que, culminada la incubación en TMG, el cultivo infectado nuevamente es resuspendido en MRS y el ciclo se retomaría. El resultado obtenido para el período de latencia, estaría reflejando una etapa intracelular subestimada por comparación con lo que en realidad ocurre.

De cualquier modo, la ocurrencia de un ciclo corto sería razonable y compatible con una etapa de adsorción lenta y una baja liberación de partículas fágicas por cada centro infectivo, aún cuando se observa la lisis de los cultivos en el primer repique de ensayos de sensibilidad. Por otra parte, se piensa que en una experiencia de evolución del cultivo infectado, desarrollada íntegramente en caldo MRS-Ca, algunas partículas fágicas encuentran rápidamente al receptor y comienzan el ciclo lítico, mientras que otras demoran más tiempo, produciéndose de ese modo el fenómeno de adsorción lenta de la población de fagos en su conjunto, y no de cada partícula fágica individual.

III.2.4 Estudios sobre paredes celulares

Se conformaron cuatro sistemas por combinación de paredes celulares purificadas de *Lb. casei* ATCC 393 y *Lb. casei* ATCC 27139, con tres fagos. Los fagos PL-1 y J-1 se emplearon sobre *Lb. casei* ATCC 393 y los fagos J-1 y MLC-A, con *Lb. casei* ATCC 27139.

La eficacia de rotura fue monitoreada por recuento bacteriano en placa (microtécnica), y se midió como la disminución en la concentración de células viables (enteras) luego de la etapa de disrupción mecánica, obteniéndose valores de aproximadamente 60 y 70% para *Lb. casei* ATCC 393 y *Lb. casei* ATCC 27139, respectivamente.

De los ensayos realizados para estudiar la adsorción sobre paredes celulares, en primer lugar se observó que en ningún caso fue necesaria la viabilidad celular para la ocurrencia de esta etapa, ya que las adsorciones siempre fueron superiores a 80% sobre paredes control (sin tratamiento).

III.2.4.1 Ensayos de adsorción sobre paredes celulares tratadas

Tratamientos térmicos

Con relación a los tratamientos de calentamiento, se tuvieron resultados diferentes en función de los sistemas estudiados y del medio empleado para la resuspensión de las paredes (Fig. 35).

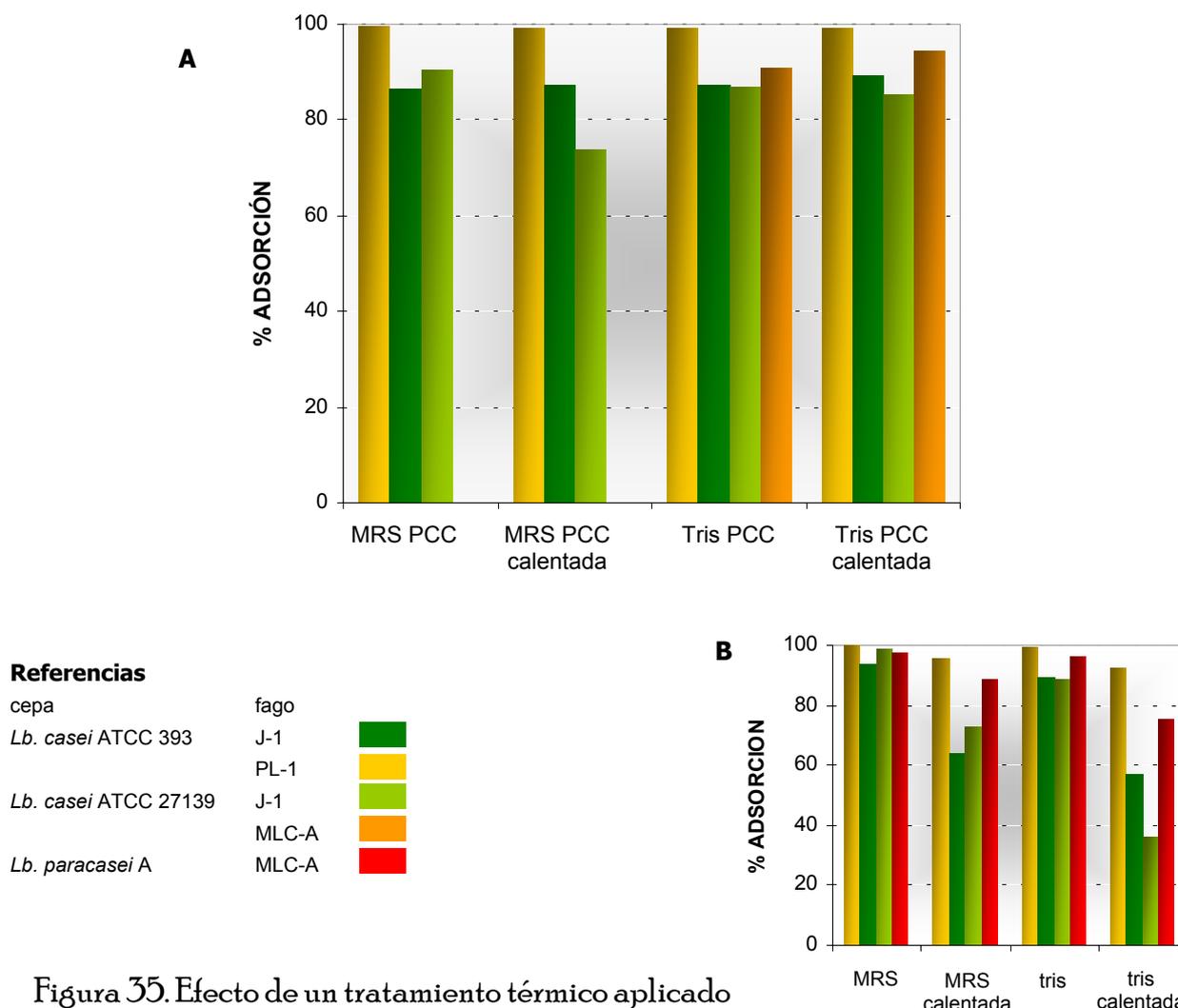


Figura 35. Efecto de un tratamiento térmico aplicado sobre (A) las paredes celulares purificadas (PCC) y (B) células enteras de *Lb. casei* resuspendidas en caldo MRS y en tris-HCl (50 mM, pH 7,5), sobre la adsorción de los fagos (30 min de incubación a 37°C). Los valores son la media de tres determinaciones.

La adsorción del fago MLC-A sobre paredes de *Lb. casei* ATCC 27139 (en tris-HCl, 50 mM, pH 7,5) no se modificó por aplicación del tratamiento térmico sobre las paredes. Los dos sistemas que surgen de la combinación entre la cepa *Lb. casei* ATCC 393 y los fagos PL-1 y J-1, no mostraron diferencias significativas entre los valores de adsorción obtenidos para las paredes control con y sin tratamiento térmico, ni en caldo MRS, ni cuando se resuspendieron en buffer tris-HCl (50 mM, pH 7,5). En cambio y sólo para caldo MRS, la

adsorción de J-1 sobre *Lb. casei* ATCC 27139 fue mayor en paredes control sin calentar (90,6%), que en paredes a las cuales se les aplicó el tratamiento (74,0%) (Fig. 35A).

En el caso de las paredes celulares de *Lb. casei* ATCC 27139, se observó una importante reducción en el tamaño del pellet de paredes calentadas, a comparación de las sin tratar. Lo mismo se observó para células enteras, y no sólo de esa cepa sino también para *Lb. casei* ATCC 393 y *Lb. paracasei* A, con disminuciones más notables cuando se hallaban resuspendidas en caldo MRS, que en tris-HCl.

Dado que en los siete sistemas a los que se les estudió la adsorción empleando célula entera resuspendidas en caldo MRS, se encontraron diferencias significativas entre aplicación o no de tratamientos térmicos, se decidió repetir esos ensayos, pero probando además las resuspensiones en tris-HCl (50 mM, pH 7,5). De este modo se intentó evaluar la influencia del medio de resuspensión utilizado.

Cuando la aplicación del tratamiento fue sobre preparaciones de **células enteras** de las cepas *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. casei* ATCC 393, resuspendidas en ambos medios, se obtuvieron diferencias significativas entre las adsorciones sobre paredes tratadas y sin tratar, para todos los sistemas y los dos medios. Incluso, las diferencias fueron más importantes cuando el medio de resuspensión usado fue tris-HCl. Lo mismo se observó para *Lb. paracasei* A y el fago MLC-A (Figura 35 B).

Tratamientos químicos y enzimáticos

En cuanto a los tratamientos químicos y enzimáticos, en general se observaron disminuciones significativas en los porcentajes de adsorción para las paredes tratadas con mutanolisina y TCA, mientras que para tratamientos con proteinasa K y SDS los valores fueron muy similares que para las paredes control (Fig. 36).

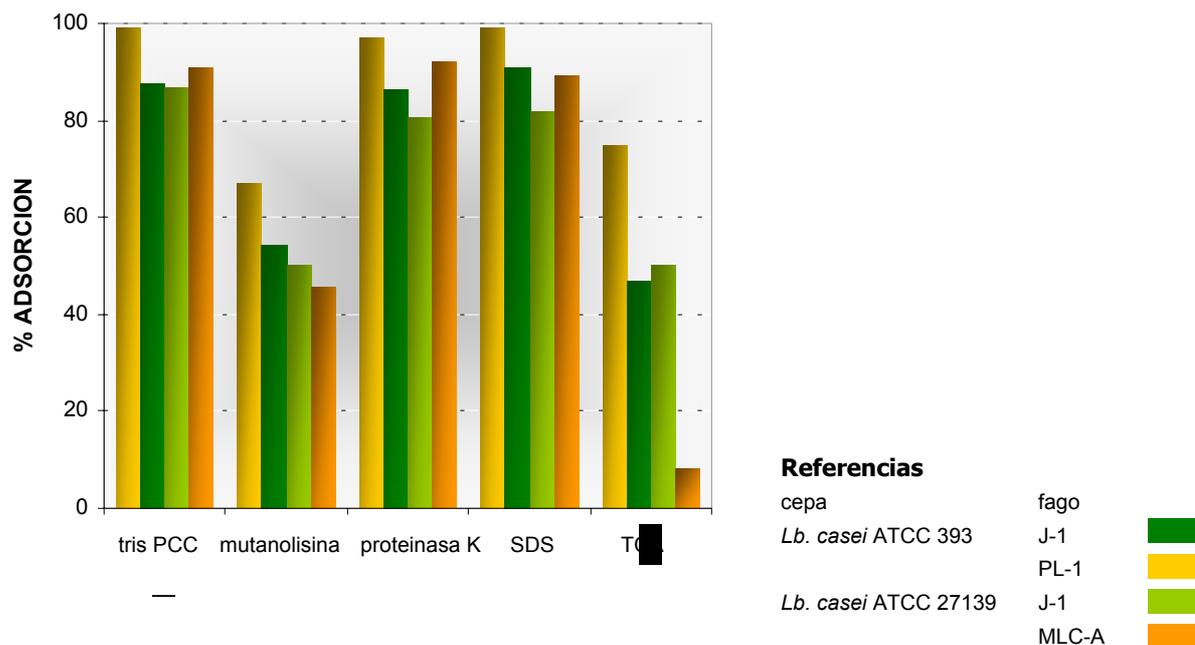


Figura 36. Adsorción (% de partículas fágicas adsorbidas luego de 30 min a 37°C) de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A sobre paredes celulares tratadas de *Lb. casei*. Las barras identificadas “tris PCC” corresponden a las adsorciones producidas sobre paredes celulares sin tratamiento, resuspendidas en buffer tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Los valores son la media de tres determinaciones.

La proteinasa K hidroliza las uniones peptídicas y el SDS (1%) remueve y desnaturaliza las proteínas de la pared, sin afectar al péptido glicano ni a las moléculas ligadas covalentemente a él. Las tasas de adsorción luego de la aplicación de estos tratamientos fueron prácticamente idénticas a las obtenidas sobre las paredes control. La única excepción se observó para el fago J-1 sobre paredes de *Lb. casei* ATCC 27139, ya que paredes sometidas a tales tratamientos mostraron valores de adsorción ligeramente disminuidos (diferencias entre 5 y 6,5%) si se comparan con el obtenido sobre las paredes control. Sólo en este único caso, podría considerarse posible la existencia de algún componente proteico como parte constituyente del receptor.

La mutanolisina es una enzima que hidroliza el peptidoglicano de la pared celular. Su aplicación sobre las paredes produjo importantes disminuciones en las adsorciones, considerando los valores alcanzados con los controles, obteniéndose para todos los sistemas

porcentajes de adsorción inferiores a 67,2%. También el tratamiento con 5% de TCA actúa sobre componentes de naturaleza hidrocarbonada, removiendo una fracción soluble de los polisacáridos, mientras que permanecen en la pared una fracción insoluble y los ácidos teicoicos (Callegari, 1992), si bien en el caso de paredes de *Lb. casei* no se encuentran presentes, tal como se mencionara previamente en la Introducción. Frente a este tratamiento, los sistemas mostraron en general, la mayor variabilidad (8,2 a 74,7% de adsorción), aunque el fago J-1 para las dos cepas, arrojó valores similares (46,9 y 50,0%). Tal observación resulta lógica suponiendo que el fago reconocería el mismo, o similar, receptor sobre ambas células (también para paredes tratadas con mutanolisina los porcentajes observados, para este sistema son parecidos). Por otro lado, el sistema formado por paredes de *Lb. casei* ATCC 27139 y el fago MLC-A fue el más afectado por ambos tratamientos, obteniéndose las diferencias más marcadas respecto de las adsorciones sobre paredes control. Las disminuciones observadas indicarían la existencia de componentes de origen hidrocarbonado en los receptores para los fagos.

III.2.4.2 Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas

Para estudiar la reversibilidad en la unión de los fagos a los receptores, se permitió la adsorción de las partículas virales a las paredes control y luego se analizó si se producía la desorción espontánea a lo largo de un tiempo de incubación prolongado. Los resultados obtenidos se encuentran graficados en la Fig. 37.

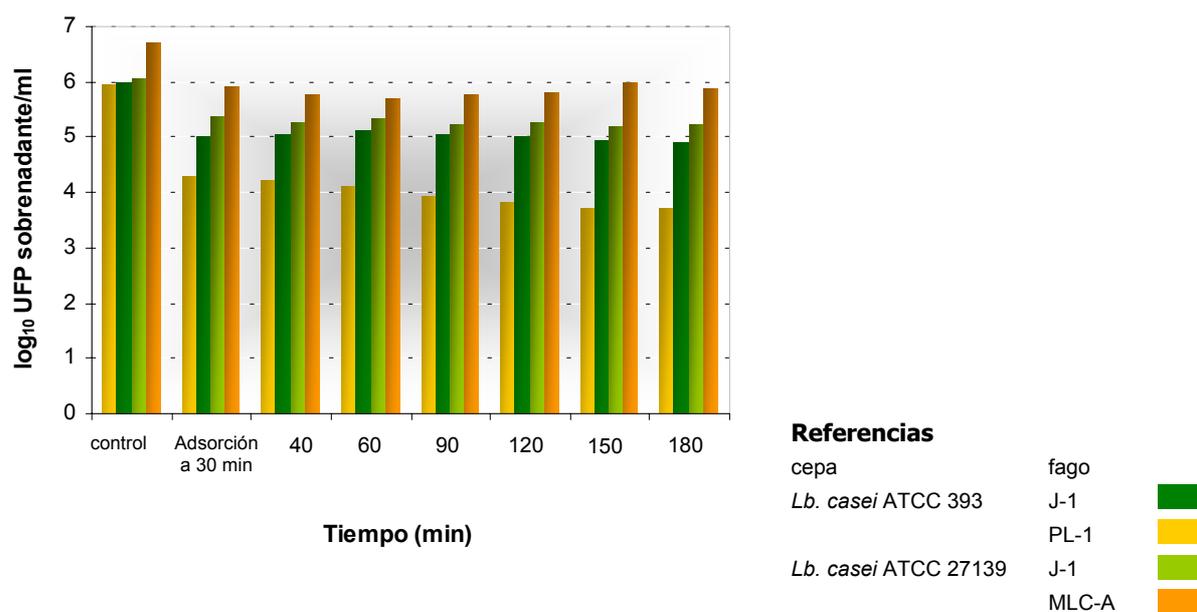


Figura 37. Irreversibilidad de la adsorción fágica a paredes celulares puras de *Lb. casei* (fagos libres en el sobrenadante luego de la adsorción, 30 min a 37°C). Las barras identificadas “control” representan las concentraciones de fagos iniciales puestas en contacto con las paredes celulares. Los valores son la media de tres determinaciones.

Para los cuatro sistemas evaluados, la mayor parte de las partículas fágicas se adsorbieron durante los primeros 30 min de incubación, lográndose porcentajes de 97,8% (ATCC 393 / PL-1), 89,5% (ATCC 393 / J-1), 80,0% (ATCC 27139 / J-1) y 84,0% (ATCC 27139 / MLC-A). Luego de ese tiempo, los recuentos se mantuvieron prácticamente invariables, indicando que no existe una tendencia a la desorción espontánea de las partículas fágicas desde los receptores situados en las paredes, durante el tiempo evaluado en el ensayo. En el caso del fago PL-1 sobre *Lb. casei* ATCC 393, se observó incluso una leve pero constante disminución en los títulos fágicos, indicando que la adsorción se continuaba produciendo durante todo el ensayo (99,4% de adsorción a los 180 min, contabilizados desde el instante de contacto entre el fago y las paredes).

III.2.4.3 Ensayos de neutralización fágica con monosacáridos

En función del hallazgo de que los receptores estarían conformados, al menos principalmente, por componentes de origen hidrocarbonado, los fagos se incubaron con soluciones de monosacáridos a fin de determinar de modo preliminar, si éstos últimos eran capaces de inactivar las partículas fágicas e impedir su adsorción sobre las cepas sensibles.

Los resultados obtenidos fueron muy variables y no reproducibles para ninguno de los tres fagos estudiados (datos no mostrados), por lo que no se obtuvo información acerca de cuáles de los monosacáridos ensayados, ejercen un efecto neutralizante de las partículas fágicas.

Finalmente, se consideró que esta técnica, previamente aplicada en el laboratorio de modo rutinario para el estudio de receptores de fagos específicos de otras bacterias lácticas, es inapropiada para estos fagos y fue necesario diseñar nuevos ensayos. Para esto, se aplicaron metodologías que utilizaron algunos monosacáridos particulares y cuyos resultados se explicitan a continuación.

III.2.4.4 Ensayos de desorción y competencia con monosacáridos, en la adsorción de los fagos sobre las paredes celulares

Para estos ensayos se seleccionó a la L-ramnosa debido a que, según reportes de algunos autores (Yokokura, 1971; Ishibashi y col., 1980), estaría formando parte del receptor para los fagos de colección J-1 y PL-1 en sus cepas sensibles *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. paracasei* ATCC 27092. A modo de control negativo, se eligió a la D-ribosa por ser, entre los monosacáridos comúnmente empleados en el laboratorio para el estudio de receptores, la que más se diferencia en estructura (pentosa) de la L-ramnosa (hexosa). La idea de incorporar un monosacárido diferente en estructura como control negativo, fue la de descartar que las interferencias en las adsorciones pudieran producirse de un modo inespecífico.

Como se observa en la Fig. 38, en general la L-ramnosa mostró un notable efecto en la adsorción de los fagos sobre las paredes celulares, tanto en los ensayos de competencia como

en los de desorción. En el primer caso, todos los sistemas se vieron afectados por la presencia de L-ramnosa que compitió por las partículas fágicas con los receptores, y logró disminuir considerablemente la tasa de adsorción desde 85 – 99% (adsorciones control) a valores de 4 – 40%. En los ensayos de desorción, excepto para J-1 sobre *Lb. casei* ATCC 393 (Fig. 38b), los porcentajes de fagos que continuaron adsorbidos a los 5 min de contacto con el monosacárido, fueron menores aún que para el ensayo de competencia. Más aún, a los 60 min de incubación con la L-ramnosa, sólo MLC-A continuó adsorbido (13,6%) sobre paredes de *Lb. casei* ATCC 27139.

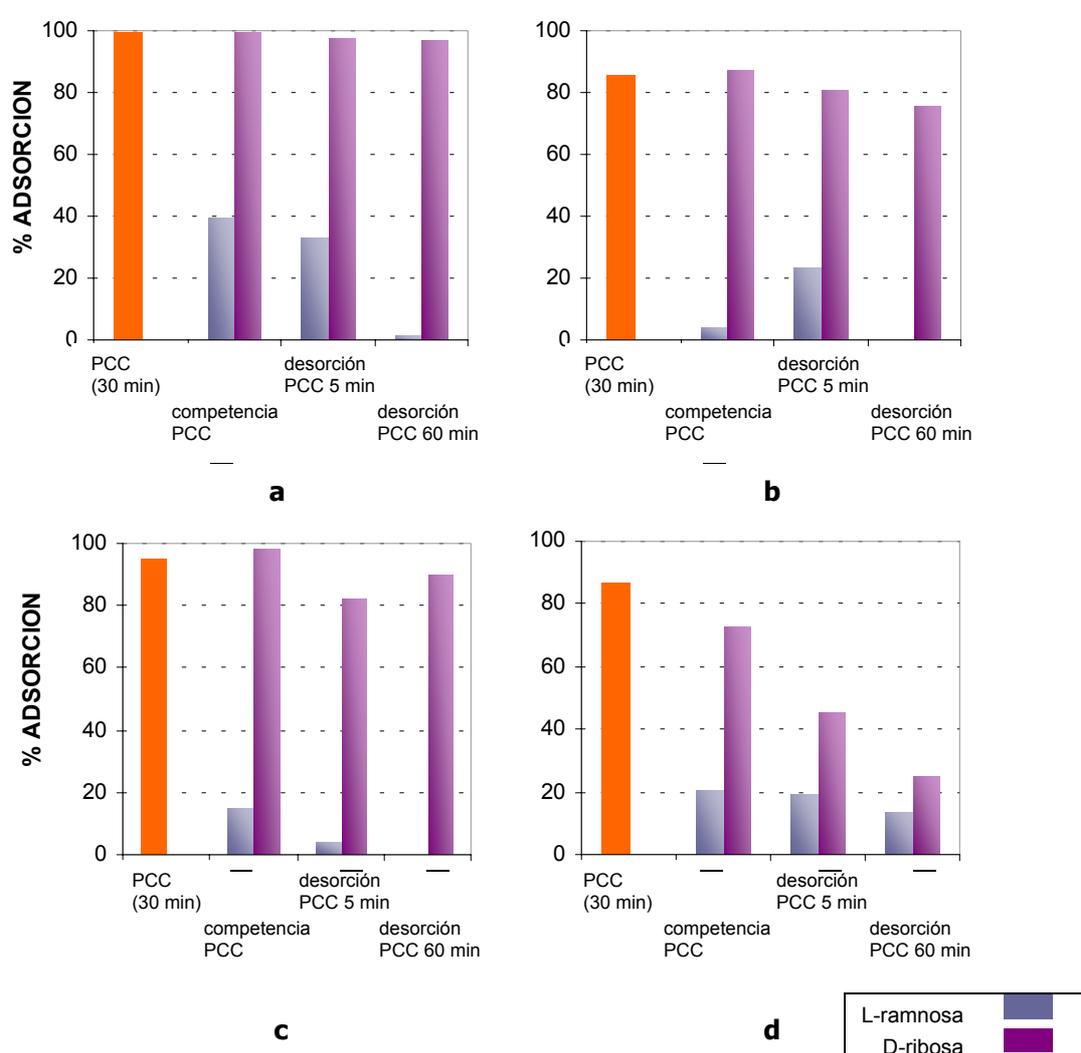


Figura 38. Ensayos de desorción y competencia con L-ramnosa y D-ribosa, en la adsorción sobre paredes celulares puras de *Lb. casei* ATCC 393 con los fagos PL-1 (a) y J-1 (b) y *Lb. casei* ATCC 27139 con los fagos J-1 (c) y MLC-A (d). Las barras identificadas “PCC (30 min)” corresponden a las adsorciones producidas sobre paredes celulares sin tratamiento, resuspendidas en buffer tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Los valores son la media de tres determinaciones.

Con respecto a la D-ribosa, no mostró efecto durante las pruebas de competencia, salvo en el caso del fago MLC-A que logró disminuir un 14,4% la adsorción respecto del control. También en el caso de las desorciones, para este fago los valores de adsorción sobre las paredes de *Lb. casei* ATCC 27139 disminuyeron para 5 (al 45,0%) y 60 min (al 25,0%) (Figura 38d). Los demás sistemas prácticamente no se vieron afectados en este tipo de ensayos.

Estos resultados permitieron aceptar, en forma preliminar, a la L-ramnosa como monosacárido constituyente del receptor para los tres fagos. Esto es particularmente importante en el caso del fago aislado en nuestro país y para el cual, también la D-ribosa tendría algún tipo de participación durante la primera etapa del ciclo de multiplicación.

Por otro lado, los resultados obtenidos en estos ensayos demostraron que el diseño de las experiencias previamente realizadas para evaluar la capacidad de inactivación de fagos de diferentes monosacáridos, no es el adecuado para este tipo de sistemas fago / cepa. La L-ramnosa, que para ninguno de los tres fagos dio muestras de alguna interacción con ellos según las primeras pruebas, tuvo un comportamiento totalmente opuesto durante las pruebas de competencia y desorción. Tampoco la D-ribosa presentó resultados coherentes entre el primero y segundo diseño de experiencias.

III.3 Aislamiento de mutantes espontáneos fago resistentes

III.3.1 Aislamiento a partir de cultivo secundario y de medio agarizado

Las cepas *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. paracasei* A fueron empleadas para obtener mutantes espontáneos fago resistentes frente a los fagos J-1 y MLC-A, respectivamente.

Cabe destacar que la búsqueda de mutantes en cepas pertenecientes a esta especie resultó compleja y particular, en comparación con la experiencia previa del grupo de trabajo en este tema, por lo que requirió de importantes modificaciones en la metodología.

Para *Lb. paracasei* A se aislaron 42 variantes potencialmente resistentes por la técnica de aislamiento en medio agarizado y en dos oportunidades se aplicó la técnica de aislamiento a partir de cultivo secundario, obteniéndose en total 64 mutantes.

Para *Lb. casei* ATCC 27139, directamente se empleó la técnica de cultivo secundario y se aislaron 17 clones potencialmente resistentes frente a J-1.

III.3.2 Caracterización del fenotipo de fagorresistencia para los mutantes obtenidos

III.3.2.1 Confirmación de la fagorresistencia

Trabajando con *Lb. paracasei* A, de las 42 variantes potenciales (aislamiento en medio agarizado) no se recuperó ningún clon resistente verdadero: 23 clones lisaron completamente en el primer repique de sensibilidad y 19, en el segundo. Respecto a la técnica de aislamiento a partir de cultivo secundario, los 39 clones obtenidos en el intento inicial lisaron al primer repique, mientras que para el segundo grupo de mutantes aislados, se procedió según una metodología alternativa, indicada en Materiales y Métodos.

Esta metodología se basó en la observación de que los clones se expresan como resistentes cuando en el medio se encuentra presente el fago. Si a esos clones se los “lava de fagos” por sucesivas estrías en MRS agarizado, al enfrentarlos nuevamente con el fago, en general se muestran sensibles, haciendo imposible la recuperación de mutantes. En un intento por obtener algún clon resistente, y considerando la falta de experiencia respecto de la fagorresistencia en las bacterias probióticas, se decidió dar una nueva oportunidad a los cultivos de los clones que resultaron sensibles en el primer repique de sensibilidad (véase la sección II.6.2.1).

Empleando este nuevo criterio, se trabajó con 25 clones aislados, 1 de los cuales lisó al primer repique, 5 mostraron muy escaso desarrollo durante el segundo repique de sensibilidad y fueron eliminados, y 19 se recuperaron como resistentes frente al fago MLC-A.

De los 17 clones obtenidos para *Lb. casei* ATCC 27139, se recuperaron 12 como verdaderos mutantes resistentes al fago J-1. Los otros 5, no fueron capaces de superar los repiques de sensibilidad, evidenciándose como resistentes falsos.

III.3.2.2 Estabilidad de la fagorresistencia

La estabilidad a la fagorresistencia se evaluó, en primera instancia, según lo detallado en la sección II.6.2.2. Se encontró que 100% y 91,6% de los clones resistentes derivados de *Lb. paracasei* A y *Lb. casei* ATCC 27139 resultaron estables frente a MLC-A y J-1, respectivamente. El único clon de *Lb. casei* ATCC 27139 que modificó su fenotipo de fagorresistencia, lisó al primer repique de estabilidad.

Todos los demás clones, resistentes y estables, fueron conservados por congelamiento a partir de cultivos **infectados** con el fago correspondiente. La razón de esta forma atípica de conservación, es asegurar, mediante la presencia del fago en el medio, la expresión del fenotipo de resistencia.

III.3.2.3 Espectro de resistencia fágica de los mutantes obtenidos

El objetivo de estos ensayos fue investigar si la resistencia lograda frente a los fagos con los cuales se obtuvieron las variantes, se conservaba al enfrentar a tales clones con otros fagos de *Lb. casei*/*paracasei*.

Los 19 mutantes resistentes a MLC-A se reactivaron a fin de evaluar su resistencia frente a los fagos PL-1 y J-1. A su vez y a modo de control, se repitieron los ensayos de sensibilidad frente al fago MLC-A. Los mutantes se comportaron de modo similar frente a los tres fagos ensayados, mostrándose en casi todos los casos resistentes durante los tres repiques. Dos de los mutantes (M6 y M10) fueron la excepción, lisando en el primer repique del ensayo frente a PL-1, J-1 e incluso frente a MLC-A, revirtiendo el fenotipo de resistencia antes expresado. Debido a estos resultados, ambas variantes fueron eliminadas.

También los derivados congelados de *Lb. casei* ATCC 27139 se reactivaron para evaluar su resistencia frente a los fagos MLC-A y PL-1 y corroborar su fenotipo resistente

frente a J-1. En este caso, los mutantes evidenciaron ciertas diferencias en sus comportamientos. De los 11 clones descongelados, 8 se comportaron en modo similar frente a los 3 fagos ensayados, mostrándose resistentes durante los tres repiques de sensibilidad. Por el contrario, un mutante (M11) lisó frente a los 3 fagos en el primer repique de sensibilidad, revirtiendo incluso la resistencia antes demostrada frente a J-1. Otro mutante (M4), si bien fue resistente frente a PL-1, no superó el segundo repique frente a los otros dos fagos. Y finalmente otro clon (M10) fue resistente frente a los fagos de colección, pero lisó en el segundo repique frente a MLC-A. De acuerdo a los últimos resultados, los clones que revirtieron su resistencia frente a J-1 (M4 y M11) fueron eliminados.

III.3.3 Nuevo criterio de estabilidad para los mutantes resistentes obtenidos

El análisis detallado de los resultados hasta aquí obtenidos, sugirió que las pruebas de estabilidad, lejos de significar una fuerte presión de selección debido a la continua adición de fagos en los sucesivos repiques, parecían favorecer a la expresión del fenotipo de resistencia fágica. Aparentemente, para un clon resultaría más difícil superar los tres repiques de sensibilidad, que los 7 repiques de estabilidad. A raíz de este comportamiento diferencial presentado por los derivados obtenidos a partir de *Lb. casei* / *paracasei* en comparación con otras bacterias lácticas, se decidió evaluar nuevamente la estabilidad, esta vez empleando la metodología descrita en II.6.3. Según ésta, se intercalan a los ensayos de sensibilidad, instancias en donde los cultivos se “lavan de fagos”, aumentando así la probabilidad de reversión del fenotipo.

Para los derivados de *Lb. paracasei* A, los resultados obtenidos fueron totalmente discordantes, considerando los recogidos según la primera metodología empleada. De los 17 clones y en las estrías realizadas para purificarlos, 4 presentaron diversidad en la morfología de colonia (Tabla 14), por lo que se recuperaron 22 mutantes resistentes totales. El 81,8% de los clones se mostraron sensibles en el primer repique del primer ensayo de sensibilidad, un clon (M23) lisó en el primero del segundo ensayo y el 13,6% de los clones alcanzó el último repique del tercer ensayo de sensibilidad, lisando finalmente (Tabla 14).

Tabla 14. Evaluación de la estabilidad de clones derivados a partir de *Lb. paracasei* A, según la metodología descrita en la sección II.6.3 de Materiales y Métodos.

Derivado fago resistente	Variante morfológica	1° ensayo de sensibilidad	2° ensayo de sensibilidad	3° ensayo de sensibilidad	Desarrollo ³
M1		- - -	- - -	- - +	En el día
M2		+			96 hs
M3		+			24 hs
M4	blanca	+			24 hs
M7		- - -	- - -	- - +	En el día
M11		+			96 hs
M12		- - -	- - -	- - +	En el día
M13	crema	+			48 hs
	blanca	+			72 hs
M16		+			48 hs
M17	crema-crema	+			24 hs
	crema-blanca	+			48 hs
	blanca	+			72 hs
M19		+			32-36 hs
M20	crema	+			32-36 hs
	blanca	+			72 hs
M21		+			24 hs
M22		+			16-18 hs
M23		- - -	+		En el día
M24		+			16-18 hs
M25	grande	+			16-18 hs
	pequeña	+			16-18 hs

También con los derivados de *Lb. casei* ATCC 27139 se obtuvieron resultados incoherentes con relación a los primeros recogidos según el primer criterio para evaluar la estabilidad. De los 9 clones que siguieron mostrándose como resistentes (véase la sección III.3.2.3), 5 presentaron diversidad en la morfología de colonia (Tabla 15), por lo que se recuperaron 15 mutantes resistentes totales. El 66,7% de los clones fue eliminado en diferentes repiques del 1° ensayo de sensibilidad, el 20%, durante el segundo ensayo de

³ Tiempo (hs) transcurrido desde la lisis, causada por el fago correspondiente, hasta que el cultivo en estudio logró un desarrollo visible, durante los ensayos de estabilidad.

sensibilidades y sólo dos clones llegaron hasta el tercer ensayo y fueron eliminados en el tercer repique de esa sensibilidad (Tabla 15).

Tabla 15. Evaluación de la estabilidad de clones derivados a partir de *Lb. casei* ATCC 27139, según la metodología descrita en la sección II.6.3 de Materiales y Métodos.

Clon fago resistente	Variante morfológica	1° ensayo de sensibilidad	2° ensayo de sensibilidad	3° ensayo de sensibilidad	Desarrollo ⁴
M1	crema	- +			24 hs
	crema R*	- +			24 hs
	gigante-crema-crema	- - -	- +		fin del día
M2	grande	- - -	- - -	- - +	fin del día
	pequeña	- - -	+		fin del día
M5		+			24 hs
M6		- - -	- - -	- - +	fin del día
M8		- +			16-18 hs
M9	grande	+			48 hs
	pequeña	+			48 hs
M10	crema	- +			16-18 hs
	blanca	+			48 hs
M15	crema	- +			16-18 hs
	blanca	+			48 hs
M17		- - -	- +		fin del día

Finalmente, todas las variantes fago resistentes obtenidas a partir de ambas cepas estudiadas fueron descartadas ya que sus fenotipos fueron inestables a lo largo de sucesivos repiques, según este criterio de estabilidad empleado.

Como observación adicional y general para ambas cepas ensayadas se pudo rescatar que, los clones que se mostraron **resistentes por un mayor número de repiques de sensibilidad, tardaron menos en desarrollar nuevamente** a partir de los cultivos lisados, a comparación de los que fueron lisados durante el primer ensayo de sensibilidad (Tablas 14 y 15).

⁴ Tiempo (hs) transcurrido desde la lisis, causada por el fago correspondiente, hasta que el cultivo en estudio logró un desarrollo visible, durante los ensayos de estabilidad.

DISCUSIÓN

IV DISCUSIÓN

En principio, cualquier industria o proceso tecnológico que descansa en fermentaciones bacterianas es vulnerable a las infecciones fágicas y las mismas representan una constante amenaza de serias pérdidas económicas. La industria láctea es particularmente sensible a estos ataques y por más de 70 años se han realizado intentos por mantener bajo control a los fagos, que interfieren con la manufactura de productos lácteos fermentados (Moineau y Lévesque, 2005). Actualmente, en algunos procesos industriales empleados para la manufactura de productos con probióticos, se incluye una etapa de fermentación durante la cual el cultivo probiótico aumenta su concentración o es empleado como *starter* (Watanabe y col., 1970; Forsman y col., 1993; Capra y col., 2006b). Estas propagaciones hacen que se incremente la frecuencia de ataques fágicos sobre bacterias probióticas comercialmente valiosas.

La caracterización de los fagos, su interacción con sus cepas sensibles y el conocimiento del modo en que diferentes parámetros fisicoquímicos pueden afectar su viabilidad, es de primordial importancia al momento de llevar adelante procedimientos de control que resulten efectivos para aliviar las devastadoras consecuencias de sus ataques líticos. Para fagos de bacterias probióticas y particularmente para *Lb. casei* / *paracasei*, la información disponible es muy escasa si se compara con la existente para bacteriofagos específicos de otras bacterias lácticas.

Por todos los motivos expuestos, en este trabajo se comenzaron a estudiar fagos disponibles en la colección ATCC y posteriormente, se amplió la investigación empleando fagos que se aislaron a partir de fermentaciones industriales defectuosas de una leche fermentada elaborada en nuestro país.

Los tres fagos de *Lb. casei* / *paracasei* estudiados PL-1, J-1 y MLC-A pertenecen al orden *Caudovirales* y se clasifican en el morfotipo B1 de la Familia *Siphoviridae* (Accolas y Spillmann, 1979; Ackermann y col., 1984; Ackermann, 2005) o el morfotipo B según Bradley (Bradley, 1967). Presentan morfologías similares, con cabezas isométricas entre 57 y 62 nm de diámetro y colas largas no contráctiles entre 156 y 270 nm. Para PL-1 y MLC-A se

observaron colas estriadas, en cuyos extremos presentan una estructura más compleja de placa basal, fibra caudal y espículas (sólo PL-1). Hasta el momento, todos los fagos reportados para esta especie han sido igualmente clasificados y poseen dimensiones semejantes a las mencionadas anteriormente. Entre ellos, el fago PL-2 (temperado de *Lb. casei* ATCC 27092, el cual no ha podido ser propagado por no disponerse de una cepa indicadora) es el más pequeño, con un diámetro de cabeza de 45 nm y cola de 150 nm de longitud y 10 nm de diámetro (Nakashima y col., 1998). Los fagos líticos ϕ FSV-A; ϕ FSV-B y ϕ FSV-C, indistinguibles morfológicamente del fago temperado ϕ FSW del cual derivan, muestran cabezas hexagonales de 57 nm y colas de 156 x 8 nm (Shimizu-Kadota y col., 1983). La mayoría de los fagos reportados poseen placa basal en el extremo distal de su cola y algunos, fibra caudal y estrías (Forsman y col., 1993; Herrero y col., 1994; Lo y col., 2005). La fibra caudal es un filamento que podría estar involucrado en la unión específica de las partículas fágicas a las células sensibles y consiste en un grupo de moléculas proteicas especializadas (Watanabe y col., 1982a). Estos mismos autores emplearon técnicas especiales para estudiar en detalle la morfología del fago PL-1, especialmente de las estrías que se observan a lo largo del eje de la cola. A diferencia de todos los fagos reportados para *Lb. casei* / *paracasei*, el autóctono (MLC-A) posee una cola bastante rígida y collar (Capra y col., 2006b). Probablemente, este fago es un miembro de la especie ϕ 5 de fagos de lactobacilos (Accolas y Spillmann, 1979; Ackermann y Dubow, 1987; Ackermann, 2001).

Los fagos de *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* aparecen entre los grupos fágicos más documentados, en cuanto a estudios de sus genomas, debido al impacto económico ocasionado por los mismos en la industria láctea (Brussow, 2001). Si bien en comparación con los fagos de lactococos, las características genómicas de relativamente pocos fagos de lactobacilos han sido descritas, algunos han sido abordados en detalle. Entre los específicos de *Lb. casei* / *paracasei*, los fagos temperados ϕ 393/A2 (al presente el mejor caracterizado) y ϕ FSW han sido extensamente estudiados, fundamentalmente desde el punto de vista de la lisogenia (García y col., 1997; Ladero y col., 1998; 1999) y la generación de derivados virulentos (Shimizu-Kadota y col., 1983; 2000). Incluso, en este último caso se identificó una secuencia de inserción, presente en la cepa *Lb. casei* ATCC 27139, que al

insertarse en el genoma de ϕ FSW sería responsable de la adquisición de virulencia, elemento que ha sido secuenciado (Shimizu-Kadota y col., 1985). El fago PL-1, que fue el segundo fago de *Lb. casei* aislado, también ha sido estudiado en profundidad. Posee ADN doble cadena lineal con extremos cohesivos, un %G+C de 45-48% (similar a J-1 y LC-Nu) y un genoma de aproximadamente 42 kb. Ciertos estudios de su transcripción, revelaron que los genes tempranos se expresan en los primeros 20 min, mientras que los tardíos son transcriptos por la ARN polimerasa del huésped luego de 40 min de iniciada la infección (Jarvis, 1989). Los genes de lisis de este fago han sido clonados secuenciados y expresados en *E. coli* (Kashige y col., 2000). Los genomas de los fagos de *Lb. casei* / *paracasei* aislados hasta el momento tienen un tamaño entre 35 y 44 kb presentando, en su mayoría, extremos cohesivos (J-1, ϕ AT3, LC-Nu, ϕ 393/A2 y PL-1). En los tres últimos casos, se extienden los extremos 3', mientras que para el temperado ϕ AT3, una hebra de 15 nucleótidos se prolonga desde ambos extremos 5' (Lo y col., 2005). En forma análoga, se observaron extremos cohesivos de 13 nucleótidos para el fago DT1 (*St. thermophilus*) a partir del extremo 5' (Tremblay y Moineau, 1999), lo cual es usual para fagos de bacterias Gram negativas (Herrero y col., 1994). Notablemente, el fago MLC-A aislado en Argentina parecería contar con un mecanismo de empaquetamiento de su ADN del tipo *pac*, que sólo ha sido reportado hasta el momento para el fago temperado ϕ FSW, cuyo ADN presenta redundancia terminal y permuta circularmente (Shimizu-Kadota y Tsuchida, 1984). Para algunos de los fagos de esta especie, se han construido mapas de restricción (Shimizu-Kadota y Tsuchida, 1984; Forsman y col., 1993; Herrero y col., 1994; Nakashima y col., 1994, 1998), encontrándose que el número de sitios de restricción fue considerablemente mayor que para fagos líticos de lactococos, que son altamente refractarios a la digestión por estas enzimas, pero similar a lo hallado para fagos de lactobacilos (Nakashima y col., 1994; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Sólo se han secuenciado completamente los genomas de los fagos LC-Nu, ϕ AT3 y ϕ 393/A2 (Lo y col., 2005; Tuohimaa y col., 2006), mientras que otros, lo han sido sólo en forma parcial (Nakashima y col., 1994; Kashige y col., 2000; Shimizu-Kadota y col., 2000).

Cuando se compararon los perfiles de restricción obtenidos con *EcoRI* y *HindIII*, durante la caracterización del fago MLC-A, con los correspondientes a PL-1, J-1 y

φ393/A2, se observaron para el fago aislado en nuestro laboratorio, perfiles muy diferentes. Las semejanzas encontradas entre los dos fagos de colección, especialmente en los cortes con *EcoRI*, son consistentes con las observaciones de que ambos fagos se encuentran relacionados entre sí (Séchaud y col., 1988; Guttman y col., 2005). En realidad, ambos pertenecen al mismo grupo serológico y, probablemente, PL-1 sería un mutante derivado a partir de J-1 (Watanabe y col., 1970). El tamaño molecular aproximado calculado para el genoma de MLC-A (37 kb), se sitúa dentro del rango encontrado para otros fagos conocidos de *Lb. casei* / *paracasei* (Shimizu-Kadota y Tsuchida, 1984; Forsman y col., 1993; Herrero y col., 1994; Nakashima y col., 1994, 1998; Lo y col., 2005). En general, se observa que a menores diámetros de las cápsides corresponden menores tamaños genómicos. En tal sentido, PL-2 y PL-1 se sitúan en extremos opuestos de la escala con 45 nm -35,2 kb y 60 nm - 42,2 kb, respectivamente. En nuestro caso, el fago MLC-A posee una cabeza de 57 nm de diámetro y el genoma se estimó en 37 kb (Capra y col., 2006b), con lo que tal generalización no resulta claramente evidente.

El control de la proliferación fágica descansa en el desarrollo e implementación de una variedad de medidas prácticas, tanto a nivel industrial como de laboratorio, previamente mencionadas en la Introducción. La caracterización fágica es fundamental para que el diseño y la aplicación de tales medidas se encuentren sustentados racionalmente. En el caso de cepas probióticas poseedoras de atributos exclusivos que han sido probados mediante estudios prolongados y costosos, que no son extrapolables a otras cepas relacionadas y de los cuales dependen las características del producto, ciertas estrategias válidas para el control de fagos de otras bacterias lácticas se vuelven impracticables (como la aplicación de esquemas de rotación de cepas). Por todo ésto y por la escasez de información disponible al respecto, la caracterización fisicoquímica de los fagos y de las interacciones con sus cepas sensibles, así como la influencia de diferentes factores sobre la viabilidad fágica, cobran especial importancia para fagos de bacterias probióticas.

Dependiendo del fago en particular y de las condiciones empleadas para la preparación y almacenamiento de sus *stocks*, el tiempo durante el cual los mismos

mantienen inalterada su viabilidad podrá variar considerablemente (Carlson, 2005). Ésto se pudo comprobar puntualmente para los tres fagos estudiados, cuyos comportamientos no evidenciaron un patrón común. El fago J-1 se mostró más robusto al momento de mantener la viabilidad durante el almacenamiento, ya que para las tres temperaturas probadas, las partículas viables superaron el 60% de las originales, a los 18 meses. Lo opuesto se obtuvo para PL-1, el cual exhibió las máximas pérdidas de infectividad, aún a -80°C . En cambio, según observaciones de Watanabe y col. (1970), suspensiones del fago PL-1 mostraron pequeñas disminuciones de los títulos luego de 6 meses en heladera. En una situación intermedia se ubicó el fago MLC-A, con sólo aproximadamente 4% de partículas activas hacia el mes 19 bajo temperaturas de refrigeración, aunque con valores en torno al 70 - 80% para la conservación por congelamiento en presencia de glicerol, a -20 y -80°C . También, para fagos específicos de *Lb. helveticus* (hv y ATCC 15807-B1) y *Lb. delbrueckii* (YAB, Ib₃, BYM, LL-H, Ib539) se vio la diversidad de comportamientos en la conservación de la viabilidad. Los fagos hv y ATCC 15807-B1 conservados a 4°C , se fueron inactivando paulatinamente hasta disminuir los títulos en 3 órdenes logarítmicos en dos años, mientras que a -80°C mantuvieron su viabilidad por un año. Los comportamientos diferentes se tuvieron para -20°C , donde el primer fago mantuvo su título hasta el octavo mes sufriendo luego un leve descenso y el segundo, mostró una brusca caída, cayendo tres órdenes logarítmicos en el primer año de conservación (Quiberoni, 1997). Para los fagos autóctonos YAB, Ib₃ y BYM, las pérdidas de viabilidad a 4°C fueron mayores que para los de colección LL-H e Ib539. También, a las temperaturas de congelación se vieron diferencias para los distintos fagos estudiados (Guglielmotti, 2003). Lo que se pudo observar, en general, fue una tendencia a favor de la temperatura de -80°C para un mejor mantenimiento de las partículas fágicas activas. Adicionalmente, y para la familia de fagos MLC-Ai, fue posible aislar fagos viables a partir de muestras de hielo de los *freezers* donde la industria almacena los cultivos congelados de los iniciadores.

Continuando con los estudios de viabilidad fágica, se realizaron recuentos de fagos resuspendidos en caldo MRS ajustado a diferentes pH, con incubaciones a dos temperaturas. Guttman y col., (2005) indicaron que los fagos son generalmente estables en un rango entre

5 y 8, aunque muchos toleran valores de pH por debajo de 3 ó 4. Para los tres fagos estudiados la viabilidad se mantuvo en un rango más amplio de pH cuando las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. En cambio, cuando se impuso una nueva restricción (temperatura de incubación mayor), las viabilidades decrecieron, tal como se esperaba. De todos modos, presentaron una considerable resistencia a pH extremos, con altas viabilidades entre 4 y 10 (25°C) y entre 5 y 10 (37°C). Sólo el fago MLC-A, cuando se incubó a 37°C, sufrió reducciones de alrededor del 30% de los títulos iniciales a pH 6 y superiores, pero el porcentaje de fagos infectivos a pH 4 fue extraordinariamente elevado, a comparación de los otros dos fagos PL-1 y J-1. A pH de 2 y 3 para ambas temperaturas, los tres fagos mostraron pérdidas completas de viabilidad (caídas de 6 órdenes logarítmicos) (Capra y col., 2006a, 2006b). Para el fago PL-1, Watanabe y col. (1970) estudiaron la estabilidad frente al pH (entre 2 y 11), luego de una incubación a 37°C por 30 min en medio MR, mostrando estabilidad entre 5 y 8, pero inactivándose por debajo de 4 y por encima de 10. Algunos fagos de *Lb. delbrueckii* exhibieron mayor diversidad en sus viabilidades a diferentes pH. En general se mostraron más sensibles que los fagos de *Lb. casei* / *paracasei* frente a este factor, manteniendo valores aceptables para un rango estrecho (5 - 7) (Guglielmotti, 2003). Los fagos de *St. thermophilus* se situaron entre ambos comportamientos, presentando una marcada estabilidad entre pH 4 y 8,5 y una inactivación superior al 91% de las partículas fágicas para un pH de 3 (Binetti, 2001).

Estas pruebas son imprescindibles al momento de diseñar los ensayos de adsorción para evaluar la influencia del pH y también para comprender ciertas situaciones complejas que se presentan. Por ejemplo, Guglielmotti (2003) plantea que la escasa viabilidad de los fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* podría ser la razón por la cual se encontraron en baja concentración en las muestras de yogur de las que se aislaron. Una explicación similar podría aplicarse a la observación de que los títulos de los fagos presentes en las muestras provenientes de la industria analizadas en este estudio, disminuyeron al repetirse luego de unos pocos días (cabe recordar que el pH de tales muestras es, en general, inferior a 4).

La aplicación de tratamientos físicos y/o químicos para mantener controlados a los bacteriofagos en concentraciones por debajo de las críticas es, por el momento, una de las pocas alternativas posibles para bacterias probióticas. La diversidad que exhiben los fagos en su sensibilidad frente a diversos agentes físicos y químicos, hace que no sea posible arriesgar predicciones y sea necesaria la determinación experimental en cada caso particular (Guttman y col., 2005). Si bien la estabilidad del fago PL-1 en respuesta a diversos agentes (muchas veces combinados con incubaciones o aplicados por períodos de tiempo muy prolongados) ha sido extensivamente estudiada (Watanabe y col., 1970; Lee y col., 1985; Kashige y col., 2001), esa caracterización también se abordó en este trabajo para investigar el efecto de los factores individuales y de modo de tener valores comparables a los correspondientes a otros fagos aquí estudiados. En cuanto a los tratamientos térmicos y sus efectos sobre la viabilidad fágica, resulta evidente que las pasteurizaciones habituales no son adecuadas para la completa inactivación de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A en leche, tal como se había observado con anterioridad (Quiberoni y col., 2003a; Brussow y Kutter, 2005). El fago MLC-A resultó notablemente más resistente que los fagos de colección, durante la exposición a 63°C y particularmente a 72°C (Capra y col., 2004, 2006b). Estudios realizados por Watanabe y col. (1970) con el fago PL-1, indicaron que suspensiones de título moderado ($1,7 \cdot 10^4$ ufp/ml) en caldo TM fueron estables por debajo de 50°C, mientras que a temperaturas superiores su viabilidad fue disminuyendo y resultaron casi completamente inactivadas en 5 min a 60°C.

Para las suspensiones del fago MLC-A el medio LDR podría ser protector, mientras que la sensibilidad térmica de los fagos PL-1 y J-1 no se vio influenciada por los diferentes medios de suspensión empleados en las experiencias (Capra y col., 2004, 2006b). En forma análoga, Quiberoni y col. (2003a) observaron que LDR ofreció cierta protección a suspensiones de fagos de *Lb. delbrueckii*, y lo mismo hicieron algunos autores que estudiaron fagos de otras bacterias lácticas (Daoust y col., 1965; Fabrizio y col., 1999). En cambio, frente a fagos de *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999a) y de *St. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), no se demostró influencia en favor de ninguno de los medios probados (buffer TMG, LDR y caldo MRS o tripticasa soya).

Comparando los T_{99} calculados para los fagos PL-1 y J-1, los valores hallados fueron muy similares lo cual podría asociarse con el hecho de que ambos se encuentran serológicamente relacionados (Séchaud y col., 1988). Wilkowske y col. (1954) publicaron que los fagos integrantes de grupos establecidos por serotipificación, resultaban relativamente homogéneos en cuanto a las condiciones necesarias para lograr su inactivación térmica. Por el contrario, Fabrizio y col. (1999) no encontraron una clara correlación entre resistencia térmica y grupos serológicos, ya que sólo para dos fagos con una homología antigénica extremadamente elevada, observaron termorresistencias similares.

Durante el aislamiento de fagos a partir de muestras provenientes de la industria, se produjeron situaciones especiales que ameritaron la realización de algunos ensayos a fin de comprender lo que ocurría. Si bien la metodología para el procesamiento de muestras en busca de bacteriofagos (Svensson y Christiansson, 1991) contempla un calentamiento (15 min a 90°C) de una alícuota de las mismas con el objeto de diferenciar una inhibición por fagos de una de tipo químico, en repetidas ocasiones se aislaron fagos (MLC-A3R, fMLC-A4R, MLC-A7R, MLC-A11R y MLC-A12R) capaces de soportar ese tratamiento térmico. Los fagos MLC-A3R y MLC-A12R fueron empleados para estudiar en forma preliminar su resistencia térmica partiendo, en el primer caso, de un recuento inicial elevado en caldo MRS y comparándolo con el fago MLC-A (previamente caracterizado) y en el segundo, investigando el efecto protector del medio de la muestra, en paralelo con LDR. De los resultados obtenidos se pueden extraer conclusiones interesantes.

En primer lugar, se evidenció la importancia de la concentración fágica de partida, previo a la aplicación del tratamiento térmico. Cuando el fago MLC-A se ensayó por 15 min a 90°C partiendo de 10^6 ufp/ml, no se detectaron (<10 ufp/ml) partículas viables. Mientras que, tanto MLC-A como MLC-A3R mostraron la capacidad de soportar el tratamiento partiendo de 10^8 ufp/ml, si bien se observaron importantes disminuciones respecto de los títulos iniciales. Esto podría explicarse considerando que las poblaciones fágicas no son totalmente homogéneas y de ese modo, al aumentar el número de individuos (mayor título inicial), se incrementa la probabilidad de que existan algunos más termorresistentes. La hipótesis de poblaciones virales similares con diferentes resistencias térmicas ha sido

previamente formulada (Hiatt, 1964; Quiberoni y col., 2003a). Estas cuestiones son de importancia trascendental para la industria, ya que la remoción por tratamientos térmicos de fagos presentes en la materia prima, será o no efectiva en función de la concentración inicial de los mismos.

En los ensayos realizados con el fago MLC-A12R, se encontró un claro efecto protector del medio en el cual provienen las muestras de Tanque de Fermentación, por comparación con LDR (para pH similares). Además, aunque se produjo una reducción importante de los recuentos iniciales, el fago mostró una resistencia térmica elevada, cuando aún partículas suspendidas en LDR y partiendo de una concentración aproximada de 10^6 ufp/ml, lograron superar el tratamiento (90°C, 15min). Si se compara con los resultados logrados para MLC-A, incapaz de soportar idéntico tratamiento, se vislumbra cómo con el tiempo, los fagos pueden desarrollar capacidades especiales que les permiten permanecer en el ambiente de la industria. Los fagos MLC-A y MLC-A12R fueron aislados del mismo ambiente industrial con una diferencia de 26 meses (Tabla 6). También frente a estos hechos, surgen puntos relevantes que las industrias fermentativas deben considerar: la potencialidad que ofrecen los medios de resultar protectivos frente a los fagos y que exigen estudios particulares, y la elevada capacidad de adaptación de los fagos.

Parada (1995) encontró que entre fagos pertenecientes al mismo grupo serológico podían observarse diferencias significativas en los valores de inactivación frente a biocidas, aunque los valores más próximos obtenidos correspondían a fagos inmunológicamente relacionados. Esto podría explicar la asombrosa similitud en el comportamiento de los fagos de colección estudiados frente a los agentes químicos ensayados. En general, los alcoholes etanol e isopropanol no fueron efectivos para inactivarlos completamente (45 min) ni tampoco al fago MLC-A, confirmando el escaso poder viricida de estos compuestos frente a fagos de bacterias lácticas. Por el contrario, el ácido peracético fue capaz de inactivar completamente suspensiones virales de los tres fagos, en alto título y en pocos minutos, reafirmando resultados obtenidos en estudios previos (Quiberoni y col., 1999a; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003a; Capra y col., 2004,

2006b). El tratamiento con ácido peracético del fago F116 (específico de *Pseudomonas aeruginosa* PAO) causa alteración estructural de la cápside viral y de su ácido nucleico, aunque no está claro si el biocida inactiva el ADN contenido dentro de la cabeza o luego de su liberación por ruptura de la misma (Maillard y col., 1996 a,b).

Notablemente, los fagos de colección mostraron una resistencia más elevada frente al hipoclorito de sodio que el fago MLC-A y otros fagos específicos de bacterias lácticas estudiadas por nuestro grupo (Capra y col., 2004, 2006b). Aún luego de 45 min de exposición, 700 ppm de este biocida no alcanzaron a inactivar suspensiones de alto título de estos fagos, mientras que en el caso de MLC-A esa reducción ($6 \log_{10}$) se logró luego de 30 min a 600 ppm, sólo con 100 – 300 ppm, para fagos de *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999a), *St. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000) y *Lc. lactis* (Suárez y Reinheimer, 2002) y 200 – 400 ppm, para fagos de *Lb. delbrueckii*. Sólo el fago Ib3 (*Lb. delbrueckii*) exhibió una resistencia extrema frente a este agente químico, requiriendo 1200 ppm (45 min) para inactivar sus suspensiones (Quiberoni y col., 2003a). Maillard y col. (1998) encontraron que el hipoclorito de sodio produce la agregación de las proteínas de la cola del fago F116, y una alteración estructural importante de su cápside, probablemente liberando el ácido nucleico al medio circundante.

Continuando con la caracterización de los fagos de *Lb. casei* / *paracasei*, se investigaron distintos aspectos de sus interacciones con sus cepas sensibles. Uno de ellos fue la influencia de los iones calcio y magnesio en el ciclo lítico de los fagos. Un modo de impedir la proliferación fágica se basa en el empleo de medios inhibidores de fagos (PIMs) (mencionados en la Introducción), que contienen agentes quelantes en su composición. Se observó que tales compuestos son capaces de inhibir la proliferación al atrapar los cationes divalentes (Shafia y Thompson, 1964; Das y Marshall, 1967; Hicks y Suijawan, 2002), siendo aplicable al control de fagos que los requieran en alguna instancia para culminar sus ciclos líticos (Whitehead y col., 1993). En realidad, la dependencia de estos cationes es variable, siendo en general el calcio más efectivo que el magnesio. Los fagos PL-1, J-1 y ϕ 393/A2 lisaron los cultivos aún en ausencia de calcio y de magnesio, aunque lo hicieron más lentamente que en su presencia. La influencia en la formación de placas de lisis fue más

importante, ya que para J-1 se alteró la morfología de las mismas y el EOP y para PL-1, directamente no se visualizaron cuando ambos cationes estuvieron ausentes (Capra y col., 2006a). Algunos autores (Séchaud y col., 1989; Binetti y col., 2002; Guglielmotti, 2003), trabajando con fagos específicos de otras bacterias lácticas que tampoco requieren del calcio de un modo indispensable, hallaron resultados similares a los obtenidos en este trabajo. En cambio, el fago autóctono MLC-A estudiado sobre *Lb. paracasei* A, se comportó diferente exhibiendo un requerimiento absoluto por estos cationes para poder completar la lisis en caldo y la formación de placas visibles, con lo cual la posibilidad de aplicación de PIMs no debería descartarse. Aquí también el calcio resultó más eficiente que el magnesio en medio agarizado, dando placas más nítidas y recuentos más elevados (Capra y col., 2006b). Igual dependencia frente a calcio mostró el fago ATCC 15807-B1 (*Lb. helveticus*), aún cuando hv (lítico para la misma especie) fue independiente de la presencia de este catión (Quiberoni y Reinheimer, 1998). Tres fagos de *Lc. lactis* ($\phi 31$, $\phi 48$ y $\phi 50$) también requirieron de calcio para resultar infectivos, aunque el magnesio no pudo reemplazarlo (Alatossava y Klaenhammer, 1991). Watanabe y Takesue (1972), estudiando el requerimiento de calcio del sistema *Lb. paracasei* ATCC 27092 / PL-1, encontraron que en ausencia de este ion no se produce la penetración del genoma fágico dentro de la célula y que si bien las partículas fágicas lograban adsorberse sobre la superficie bacteriana, se inhibía la infección. Además, observaron que aún cuando esa inhibición podía revertirse por adición de calcio, cuanto más se demoraba ese agregado la posibilidad se iba perdiendo en forma gradual probablemente porque los genomas fágicos se escapaban de las cápsides. Por otro lado, estudiaron el efecto de otros cationes divalentes y vieron que el Sr^{2+} se comportó similar al Ca^{2+} al promover la formación de células infectadas por fagos, mientras que el Mg^{2+} fue notablemente menos efectivo (Watanabe y Takesue, 1972).

El estudio de los espectros de huéspedes provee información que puede emplearse para indagar en los orígenes de nuevos fagos y las relaciones entre fagos de lactobacilos, así como también para plantear estrategias de control de los mismos (Forde y Fitzgerald, 1999). Los 7 fagos empleados fueron altamente específicos frente a *Lb. casei* y *Lb. paracasei*, similar a lo observado por Watanabe y col. (1970) para PL-1, y presentaron idéntico espectro de

huéspedes. Cabe destacar que la pertenencia de una determinada cepa a una de estas dos especies no tiene aún en la actualidad una consensuada definición, si bien la taxonomía vigente las considera como diferentes. En cambio para *Lb. rhamnosus*, también incluido en el grupo *casei* pero con características propias más definidas y generalmente aceptado como una especie diferente, todas las cepas empleadas fueron resistentes al igual que frente a *Lb. gasserii*. El hecho que todos estos fagos sean capaces de lisar las mismas cepas sugiere la posibilidad de que sean similares entre sí, al menos en lo que respecta a los receptores que reconocen sobre las superficies bacterianas. La observación es probablemente más razonable entre los fagos de colección (el fago PL-1 habría derivado de J-1) y para los 4 fagos aislados en nuestro país, que si bien se emplearon en estos ensayos por mostrar perfiles de restricción diferentes, podrían todos derivar de un ancestro común. Por otra parte, se sabe que las adhesinas (elementos de reconocimiento del receptor) específicas de un fago, frecuentemente son muy complejas y versátiles, capaces de reconocer receptores bastante diferentes en bacterias distintas, tal como una llave maestra puede abrir diferentes cerraduras. Las regiones que codifican para adhesinas son las más variables dentro de los genomas fágicos (Kutter y col., 2005). El rango de huéspedes obtenido para los fagos investigados en este trabajo fue más amplio que el reportado por Herrero y col. (1994) para ϕ 393/A2, el cual fue lítico sólo para dos cepas de *Lb. casei* ssp. *casei*, entre 23 cepas testeadas pertenecientes a 3 especies de *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei* ssp. *casei*, *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* o *Lb. brevis*). Algunos autores atribuyen, en parte, el acotado rango de huéspedes que presentan los fagos de *Lb. casei* / *paracasei* a la inmunidad a la superinfección, debido a que en esta especie, el fenómeno de lisogenia ha demostrado ser excepcionalmente habitual (Séchaud y col., 1988; Forsman y col., 1993).

Las experiencias de crecimiento en un paso se emplean para conocer ciertos parámetros que rigen las interacciones fago / cepa. Los ciclos de multiplicación de los fagos PL-1, J-1 y MLC-A al infectar diferentes cepas de *Lb. casei* / *paracasei* fueron caracterizados a través de sus parámetros de multiplicación fágica, obteniéndose períodos de latencia entre 5 y 90 min, *burst times* entre 120 y 140 min y *burst sizes* entre 32 y 160 ufp / centro infectivo. Según la escasa información existente en relación con parámetros de

multiplicación de fagos de *Lb. casei*, se vio que los valores correspondientes a períodos de latencia informados previamente (100 – 140 min) y *burst sizes* (180 – 200 ufp / centro infectivo) (Watanabe y col., 1970; Watanabe y Takesue, 1972; Nes y col., 1988; Herrero y col., 1994), son ligeramente más elevados que los obtenidos en este trabajo. El *burst size* del fago MLC-A resultó idéntico al obtenido para el fago FSW-TI (aproximadamente 70 ufp / centro infectivo), fago temperado casi indistinguible del FSV (Shimizu-Kadota y Sakurai, 1982). Los parámetros período de latencia y *burst size* son característicos de cada fago bajo determinadas condiciones particulares, pero se ven afectados por el huésped empleado, el medio y la temperatura (Guttman y col., 2005). En nuestros resultados se observan notables diferencias en los parámetros calculados para un mismo fago sobre distintas cepas. El caso más evidente fue el sistema PL-1 / *Lb. paracasei* A, que requirió de incubaciones muy prolongadas para lograr la adsorción fágica y cuyos períodos de latencia y *burst* resultaron más cortos que los demás sistemas estudiados. Ésto podría servir de explicación respecto de cómo se produce la lisis del cultivo en 8-9 hs, a pesar de tan retardada adsorción (Capra y col., 2006a). Debe además considerarse que, como se explicitara en Resultados, la latencia estaría subestimada ya que el pasaje de caldo MRS a buffer TMG se hace inmediatamente previo a la infección del cultivo, con lo cual seguramente existe una energía remanente en las células del cultivo, que permite avanzar un poco más allá de la simple adsorción, dentro del ciclo lítico del fago. Se sabe que en buffer tris-maleato, el fago PL-1 es capaz de adsorberse sobre *Lb. paracasei* ATCC 27092, pero no de inyectar su genoma. La adsorción es un proceso relativamente simple que sólo incluye el reconocimiento y la unión al receptor, mientras que la penetración del ADN se produce por una sucesión de etapas (Watanabe y col., 1987) y necesita de células con elevado contenido de ATP intracelular. Para lograr que las células carezcan de energía, además de la resuspensión en un buffer sin nutrientes, deben mantenerse allí por un tiempo para realmente disminuir la reserva energética intracelular (Watanabe y col., 1993).

El ciclo vegetativo de la multiplicación viral se inicia con un evento altamente específico: la adsorción del fago a la pared celular de la bacteria susceptible (Neve, 1996). Se sabe que la velocidad y eficiencia de la adsorción pueden variar para un determinado

sistema fago / huésped dependiendo de factores externos y del estado fisiológico del huésped (Guttman y col., 2005). Si bien esta etapa ha sido abordada para otras bacterias lácticas, la información disponible para *Lb. casei* / *paracasei* es escasa, existiendo sólo estudios minuciosos para el fago PL-1 y *Lb. paracasei* ATCC 27092. Para representar ese proceso en este sistema, se postuló y validó un modelo cinético que considera que la adsorción efectiva del fago a la célula huésped se produce primero en una etapa reversible, que posteriormente se vuelve irreversible y conlleva a la infección de la célula afectada (Watanabe y col., 1980, 1982b).

Watanabe y Takesue (1972) hallaron que el calcio no era necesario para la adsorción ni para la multiplicación intracelular, aunque sí para la penetración del ADN fágico a la célula. La inyección del genoma fágico requirió además de energía (elevados niveles de ATP intracelular) y en sus inicios, de la síntesis de proteínas por el huésped (Watanabe y col., 1979; 1991) y no se produjo a 0°C (Watanabe y col., 1987). En nuestro trabajo y en ausencia de Ca²⁺, únicamente se obtuvieron bajas tasas de adsorción para el fago MLC-A infectando *Lb. paracasei* A. Algunos fagos se inactivan en presencia de agentes quelantes debido a que los cationes divalentes son necesarios para conservar estables las estructuras de sus colas (Bassel y col., 1971). No sería este el caso para el fago MLC-A, sino que aparentemente, la interacción química entre el receptor de la cepa *Lb. paracasei* A y la adhesina del fago necesitaría estabilizarse con Ca²⁺ ya que MLC-A, cuando se adsorbe sobre *Lb. casei* ATCC 27139, no requiere de este catión. Sin embargo, evaluando por Test de Turbidez en ausencia de iones calcio al último sistema mencionado, no se observó lisis del cultivo aún luego de 4 repiques (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el catión sería necesario en algún otro punto del ciclo lítico del fago MLC-A. Para los restantes sistemas estudiados la adsorción fue independiente del calcio.

Siguiendo con los estudios realizados por Watanabe y col., éstos encontraron que, trabajando en buffer tris maleato, la adsorción fágica total (reversible + irreversible) de PL-1 sobre su huésped no era afectada por la temperatura de incubación (0 y 37°C), aunque la adsorción irreversible fue marcadamente inhibida a bajas temperaturas. Por lo tanto, a 0°C, la única que ocurría era la adsorción reversible, produciéndose un estado de equilibrio entre

fagos libres y unidos a la célula. En caldo MR y a 37°C, la adsorción total fue coincidente con la irreversible porque ésta última se produce muy rápidamente en este medio y no es posible discriminarla de la reversible. En cambio, a 0°C, ambos tipos de adsorción se diferenciaron, debido a que la adsorción irreversible se hace más lenta. En caldo MR las tasas de adsorción total obtenidas, incubando las suspensiones celulares infectadas, fueron mayores a 37°C que a 0°C (Watanabe y Takesue, 1975; Watanabe y col., 1982b). En nuestras experiencias siempre se trabajó en caldo MRS y cuantificando, indirectamente, la adsorción total. Si bien para los sistemas estudiados las adsorciones se produjeron en todo el rango estudiado (0 – 50°C) con valores óptimos a 30°C, el grado de dependencia fue diferente en cada caso. Mientras que los fagos PL-1 y MLC-A sobre *Lb. casei* ATCC 393 y ATCC 27139, respectivamente, mostraron tasas de adsorción total o casi independientes para todas las temperaturas ensayadas y superiores al 90%, los porcentajes de adsorción a 0 y 50°C para J-1 y MLC-A sobre *Lb. paracasei* A, fueron los más bajos de todos los sistemas conformados (aproximadamente entre 55 y 78%).

Con relación a la influencia de los tratamientos térmicos aplicados a las células previo al estudio de adsorción, los resultados obtenidos con el fago PL-1 y su cepa sensible difieren a los hallados durante este trabajo. Según Watanabe y col. (1987), cuando suspensiones celulares inactivadas de *Lb. paracasei* ATCC 27092 se sometieron por 5 min a inmersión en baño de agua a ebullición, no mostraron diferencias en la adsorción del fago PL-1 respecto de un control de células sin tratar. Sin embargo, el ADN fágico no salió de las cabezas cuando los fagos se adsorbieron sobre células tratadas, indicando que ese proceso sí requeriría de células vivas (Watanabe y col., 1987) y cuando la inactivación celular se produjo por exposición a luz UV, la penetración del genoma fágico disminuyó rápidamente acompañando el decrecimiento del contenido intracelular de ATP (Watanabe y col., 1993). Para todos los sistemas aquí estudiados se encontraron diferencias significativas entre las disminuidas adsorciones sobre células tratadas y los controles sobre células que no recibieron tratamiento térmico. Dos razones podrían explicar estos resultados. En primer lugar, la adsorción de los fagos podría ser dependiente del estado fisiológico de la célula sensible y, segundo, los receptores fágicos podrían ser termosensibles. Sin embargo, la

primera de las hipótesis quedaría absolutamente descartada con los valores de adsorción fágica logrados en los estudios sobre paredes celulares (discutidos más adelante en esa Tesis).

Según la bibliografía, la adsorción del fago PL-1 sobre *Lb. paracasei* ATCC 27092 no fue afectada por el pH cuando la incubación se realizó en buffer tris maleato a valores de pH entre 4,5 y 8,5 (Watanabe y Takesue, 1972). Este mismo fago, al igual que J-1 sobre *Lb. casei* ATCC 393 y J-1 sobre *Lb. paracasei* ATCC 27139, mantuvieron también elevadas tasas de adsorción a valores de pH entre 5 y 10. En cambio, la adsorción del fago MLC-A sobre las dos cepas con las que se estudió, se mostró particularmente afectada a valores de pH 4 y a 8 – 10. Es importante destacar que suspensiones de este fago mostraron disminuciones en la viabilidad a pH 8 y superiores, por lo que eso también podría estar afectando a las tasas de adsorción obtenidas.

Como se mencionó en repetidas ocasiones a lo largo de esta Tesis, el fago PL-1 infectando la cepa *Lb. paracasei* A mostró un comportamiento realmente atípico. La adsorción disminuida observada podría ser consecuencia de algún tipo de modificación, en comparación con su cepa sensible original *Lb. paracasei* ATCC 27092, ya sea por reducción en el número de sitios receptores disponibles, por modificaciones químicas menores que posibilitan la interacción fago-cepa aunque en una forma menos efectiva, o por un acceso restringido a los receptores debido a impedimentos estéricos. Un comportamiento similar fue informado para mutantes fago resistentes de *St. cremoris* (Vlegels y col., 1988). Tal como se vio en ese estudio, aumentando la relación célula / fago en la mezcla de incubación de *Lb. paracasei* A y el fago PL-1, se lograron adsorciones más elevadas (datos no mostrados) y ese incremento fue aparentemente debido a un aumento en el número inicialmente bajo de receptores disponibles para el fago o bien por un aumento en las colisiones entre fagos y células. En realidad, si para una misma cantidad de partículas fágicas se aumenta el número de células presentes, se eleva la probabilidad de que ocurra una colisión exitosa entre ambos, considerando a la adsorción como una simple interacción química.

Otro factor que favorece la adsorción del fago PL-1, es la utilización de un caldo de cultivo en lugar de un medio no nutritivo, debido a que en el primero los fagos proceden más fácilmente de un estado reversible a una unión irreversible con las células sensibles

(Watanabe y col., 1982b). Este sería otro aspecto, además del probable desfase en los ciclos líticos de distintas partículas individuales (ya explicados en Resultados), que sugiere la posibilidad de una ocurrencia más rápida de la adsorción en caldo MRS respecto de buffer TMG, y que permitirían la lisis del cultivo de *Lb. paracasei* A en el transcurso del día.

Aún en la actualidad, poco se conoce de las adhesinas de los fagos que infectan bacterias Gram-positivas y de los receptores a los cuales se unen. Existe una gran variedad de moléculas expuestas en las paredes celulares de diferentes bacterias, tales como aminoácidos e hidratos de carbono de los peptidoglicanos, los ácidos teicoicos y proteínas asociadas a pared (Kutter y col., 2005). El estudio de los receptores fágicos en *Lb. casei* se abordó debido a la escasez de información al respecto y a la ausencia de ácidos teicoicos, frecuentemente esenciales para la adsorción fágica, en las paredes celulares de esta especie (Yokokura, 1971). Sin embargo, no existen muchos trabajos al respecto y nuevamente el sistema más estudiado previamente es el de PL-1/*Lb. paracasei* ATCC 27092.

Los primeros ensayos se realizaron con el fago J-1 sobre paredes celulares de *Lb. casei* ATCC 27139, a las cuales se les aplicaron tratamientos con calor, solventes orgánicos y se les extrajo una fracción soluble en TCA (compuesta por L-ramnosa, D-glucosa y hexosaminas) (Yokokura, 1971). Se encontró que la fracción solubilizada en TCA, al igual que soluciones de L-ramnosa, eran capaces de inhibir completamente la adsorción del fago J-1 sobre las paredes y además podían desorber a los ya adsorbidos sin inactivarlos. Estos resultados indicaron que la L-ramnosa formaría parte del receptor en la pared celular de esta cepa y que la unión del fago sería reversible aún a 37°C. La inhibición de la adsorción fágica ocurriría por competencia con los receptores para el fago, siendo en tal sentido más efectiva la fracción soluble en TCA que la L-ramnosa. Ensayos con azúcares de estructura y configuración similares produjeron inhibiciones parciales en la adsorción, indicando que sería importante una determinada especificidad del monosacárido. Posteriormente, se sugirió que también la D-galactosamina estaría implicada en el receptor de *Lb. casei* ATCC 27139 (Yokokura, 1971; 1977). Observaciones prácticamente idénticas respecto de la acción de la L-ramnosa se obtuvieron para el fago PL-1 y *Lb. paracasei* ATCC 27092. Sin embargo,

la desorción disminuye con el transcurrir del tiempo, sugiriendo que se produce un aumento de fagos irreversiblemente unidos a los receptores. Otros monosacáridos ensayados (entre ellos la D-ribosa), mostraron una leve inhibición de la adsorción (Watanabe y Takesue, 1975; Watanabe y col., 1980; 1982b).

En esta Tesis, los ensayos preliminares obtenidos por aplicación de tratamientos químicos y enzimáticos a las paredes celulares, realizados sobre los distintos sistemas aquí conformados, indicaron que los receptores serían principalmente de naturaleza hidrocarbonada. Sin embargo, y aplicando nuestras metodologías, en el caso del receptor para J-1 en *Lb. casei* ATCC 27139 no podría descartarse una pequeña influencia de algún componente proteico. También Yokokura (1971), con un protocolo diferente de preparación de paredes celulares, observó que la L-ramnosa no lograba desorber completamente al fago J-1 de las paredes crudas (sin tratamiento con tripsina y pepsina) de *Lb. casei* ATCC 27139, y concluyó que sería necesario algún componente, removible por acción de las proteasas, para que la unión sea irreversible. Análogamente, otros investigadores contemplaron la posible participación de proteínas en el proceso de adsorción. Watanabe y Takesue (1975) encontraron que la adsorción irreversible de PL-1 sobre células enteras de *Lb. paracasei* ATCC 27092 se inhibía a bajas temperaturas, por lo que sugirieron que alguna reacción enzimática podría requerirse para la firme asociación de fagos a las células huésped. Incluso para ese sistema, se sugirió la participación de proteínas de membrana en el proceso de penetración del genoma fágico (Watanabe y col., 1987; Watanabe y col., 1995) y aparentemente la adsorción irreversible y la inyección del ADN fágico se encontrarían muy ligadas. Otros autores (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Kutter y col., 2005) también encontraron para ciertos fagos de lactococos, que la adsorción reversible se producía sobre combinaciones específicas de carbohidratos en la pared celular y luego era necesaria una proteína (PIP, *phage infection protein*) presente en la membrana, para lograr la unión irreversible conducente a la liberación del ADN de la cápside.

En nuestro trabajo, la primera hipótesis planteada previamente en esta sección para explicar los valores disminuidos de adsorción fágica sobre células sometidas a tratamientos térmicos quedaría descartada al considerar las tasas de adsorción obtenidas sobre paredes

para todos los sistemas conformados y estudiados en esta Tesis. Esos resultados indican que la adsorción de estos fagos es independiente de la viabilidad de la célula sensible. La segunda hipótesis (los receptores fágicos podrían ser termosensibles), pareciera también carecer de sentido al considerar que para casi todos los sistemas, las adsorciones sobre paredes celulares fueron independientes de la aplicación del tratamiento térmico (tanto en caldo como en buffer). De igual modo, la adsorción de PL-1 sobre *Lb. casei* ATCC 27092 no se modificó luego del calentamiento (100°C - 30 min) de las paredes indicando que los receptores eran termorresistentes y prácticamente los mismos resultados se obtuvieron en caldo MR y buffer tris-maleato (Watanabe y col., 1977). Sin embargo, estos autores sostienen que los receptores presentes en las paredes celulares no serían idénticos o completos como los que se encuentran en célula entera. Podría ser entonces que algún componente, no esencial para que ocurra una primera adsorción y que luego se pierde durante la obtención de las paredes celulares, presentara cierta inestabilidad al calor y por lo tanto afectara al proceso sólo sobre la célula entera. Ésto podría explicar las diferencias obtenidas, con y sin aplicación de tratamiento térmico, en las adsorciones sobre células enteras en los dos medios empleados en esta Tesis.

Nuestros resultados respecto de la unión de los fagos a las paredes purificadas, en todos los casos mostraron ausencia de desorción espontánea neta. Incluso para el fago PL-1 sobre *Lb. casei* ATCC 393 la adsorción continuó en aumento durante todo el ensayo. Ésto podría también considerarse como un estado de equilibrio entre los fagos libres y los adsorbidos reversiblemente a las paredes, en donde para el último caso mencionado, el equilibrio aún no ha sido alcanzado. Esa interpretación estaría acorde con lo obtenido por Yokokura (1971) y por Watanabe y col. (1977). Estudios previos demostraron que, a diferencia de la mayoría de los sistemas fago-pared celular de diferentes géneros de bacterias estudiados, la adsorción de PL-1 sobre las paredes de *Lb. paracasei* ATCC 27092 se produce sólo en forma reversible y existe un equilibrio entre los fagos libres y los adsorbidos a las paredes celulares. Esa incapacidad de las paredes para inactivar a los fagos, indicaría nuevamente que otros componentes celulares serían requeridos para lograr la irreversibilidad de la unión (Watanabe y col., 1977), ya que sobre célula entera, la adsorción

reversible inicial gradualmente se vuelve irreversible (Ishibashi y col., 1982). En el caso que se menciona y a diferencia del descrito por Yokokura (1971), la adsorción sobre paredes celulares crudas (sin tratamiento con tripsina) tampoco inactivó a los fagos.

Ishibashi y col. (1980) lograron mayor información aún sobre el sistema *Lb. paracasei* ATCC 27092 y PL-1 mediante el empleo de lectinas capaces de interaccionar específicamente con ciertos residuos glicosídicos presentes en las paredes. Se confirmó que residuos de L-ramnosa eran los principales determinantes en el reconocimiento, mientras que la D-glucosa también estaba involucrada, aunque en una extensión menor (Ishibashi y col., 1980). Además, se determinó que la adsorción se produjo sólo sobre la fracción de polisacáridos de pared, no así sobre las de peptidoglicano (Ishibashi y col., 1982).

A sabiendas de que los receptores en nuestros sistemas, estarían compuestos fundamentalmente de hidratos de carbono, se aplicaron técnicas de rutina empleadas en nuestro laboratorio con el fin de obtener mayor información acerca de cuáles formarían parte del receptor. Sin embargo, debido a la incapacidad de inactivación de los fagos PL-1 y J-1 por parte de los hidratos de carbono, estas técnicas no fueron de utilidad. En el caso del fago MLC-A, podrían plantearse algunas opciones: que ninguno de los azúcares ensayados estuviesen involucrados como parte constituyente del receptor; o que participen varios de ellos simultáneamente y sea necesaria una cierta conformación y combinación para lograr el reconocimiento fágico; y por último, que al igual que con los fagos de colección, si algún monosacárido se uniera específicamente al fago lo hiciera en forma reversible sin causar pérdida de infectividad de las partículas. Al igual que en nuestros ensayos de neutralización fágica con monosacáridos, resultados variables y no concluyentes fueron obtenidos previamente para algunos fagos de *Lb. delbrueckii* (Guglielmotti, 2003).

Considerando que la L-ramnosa mostró un rol protagónico en los receptores (de *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. paracasei* ATCC 27092) para ambos fagos de colección (J-1 y PL-1, respectivamente) (Yokokura, 1977; Ishibashi y col., 1982), este monosacárido fue seleccionado para realizar ensayos de desorción de los fagos y competencia con los receptores para los sistemas planteados en esta Tesis. Los resultados sugieren que la L-ramnosa sería un componente del receptor reconocido específicamente tanto por los fagos de

colección como por MLC-A. Los dos primeros fagos reconocerían un receptor similar en sus cepas madres y en *Lb. casei* ATCC 393, lo cual es razonable considerando el escaso tamaño de los genomas fágicos y la necesidad de una explotación intensiva en el uso de los genes disponibles. También para el fago autóctono MLC-A, la L-ramnosa participaría del receptor y probablemente justificaría el hecho de que los tres fagos compartan idéntico espectro de huéspedes. Sin embargo, también la D-ribosa mostró una influencia, aunque en menor grado que la L-ramnosa, en la competencia y desorción de MLC-A, que no se observó para los fagos de colección. Considerando entonces, que el fago MLC-A reconocería un receptor con L-ramnosa y D-ribosa, la hipótesis más probable entre las planteadas antes, parecería ser la que supone una unión reversible entre hidratos de carbono específicos y las partículas fágicas.

Sólo unos pocos casos, y algunos pobremente explicados, aparecen en la bibliografía con relación a la obtención de mutantes fago resistentes y la caracterización de este fenotipo para *Lb. casei*/*paracasei*.

En una primera instancia (Watanabe y col., 1970) se informa el aislamiento, en medio sólido, de aproximadamente 30 colonias que resultaron ser resistentes al fago PL-1 y derivaron de la cepa *Lb. paracasei* ATCC 27092. Esta cepa había sido incubada, a 37°C por aproximadamente una semana, en presencia de una alta concentración del fago para permitir el desarrollo de células resistentes. Además, filtrados de los sobrenadantes de cultivo de los clones resistentes no formaron placas sobre la cepa madre sensible, por lo que los autores los consideraron no lisogénicos y a PL-1 como un fago del tipo lítico (Watanabe y col., 1970). Posteriormente se demostraría la inducción del profago PL-2 por tratamiento de *Lb. paracasei* ATCC 27092 con mitomicina C (Nakashima y col., 1998) y la naturaleza temperada del fago PL-1 sobre la cepa *Lb. casei* ATCC 334 (Séchaud y col., 1988), confiriendo inmunidad a la superinfección de la cepa por los fagos homólogos 393 y ϕ 41k (Guttman y col., 2005).

En segundo lugar, se obtuvo un derivado curado del profago ϕ FSW a partir de la cepa lisógena *Lb. casei* ATCC 27139 empleada para la elaboración de Yakult, introduciendo

una mutación termoinducible en el profago (por aplicación de mutagénesis química) y seleccionando las células sobrevivientes luego de la inducción por calor (Shimizu-Kadota y Sakurai, 1982). Tal como se explicara en la Introducción, se demostró que los fagos virulentos genéricamente denominados ϕ FSV derivaban del profago ϕ FSW (Shimizu-Kadota y col., 1983), por lo que con la obtención de un mutante curado para esta cepa, se elimina la generación de fagos virulentos en esa fermentación industrial. Afortunadamente y debido a que la mutación que lo originó se localizó en el profago, esta cepa curada aparentemente conservaría las propiedades probióticas originales de cepa ancestral. Sin embargo, la cepa curada sigue siendo sensible a esos fagos virulentos ya generados y que son difíciles de erradicar del ambiente industrial y además, la cepa es susceptible de re-lisogenizar (Shimizu-Kadota y Sakurai, 1982).

Finalmente, Watanabe y col. (1984) hallaron un mutante fago resistente (*Lb. casei* YIT 9021) de la cepa *Lb. paracasei* ATCC 27092 que permite la adsorción de los fagos PL-1 y J-1, aunque sin lograr la infección de las células. Por microscopía electrónica demostraron que la fagorresistencia se produce por bloqueo de la penetración del genoma fágico. La cepa *Lb. casei* YIT 9021 fue originalmente aislada de colonias que aparecieron sobre placas de lisis confluentes del fago J-1 sobre *Lb. paracasei* ATCC 27092. En este mismo trabajo, la liberación de profagos de *Lb. casei* YIT 9021 con radiación UV y mitomicina C no fue satisfactoria. En cambio, se confirmó (por microscopía electrónica) la existencia de partículas fágicas en cultivos lisados de *Lb. paracasei* ATCC 27092 y de otra cepa de *Lb. casei* lisógena (empleada como control positivo), inducidos con mitomicina C. De acuerdo a esto, nuevamente la obtención de mutantes de *Lb. casei* / *paracasei* que mejoren su actuación frente a fagos, se vio asociada al curado de una cepa lisógena, aunque aparentemente en el último caso existen también otros aspectos involucrados.

Como se mencionara antes, una de las cepas empleadas en nuestros estudios (*Lb. casei* ATCC 27139) para la obtención de mutantes, es probadamente lisógena y su profago ha dado origen a tres fagos virulentos, es decir capaces de superar la inmunidad lisogénica. Este tipo de mutación presenta la potencialidad de causar fallas gravísimas en un cultivo iniciador monocepa lisógeno, ya que los fagos virulentos generados pueden infectar la

totalidad del cultivo (Davidson y col., 1990). La comparación de los genomas indicó que ϕ FSV-A (indistinguible de ϕ FSW), sólo tendría mutaciones puntuales o pequeños rearrreglos en su ADN, mientras que ϕ FSV-B y ϕ FSV-C eran idénticos a ϕ FSW excepto en la secuencia de inserción ISL1, que también está presente en el cromosoma bacteriano (Shimizu-Kadota y col., 1985). Se propuso que este fragmento sería el responsable de la adquisición de virulencia por el profago ϕ FSW, debido a la inactivación del operador o a la presentación de un nuevo promotor que no fuera afectado por el represor del profago. Ambas situaciones permitirían la expresión constitutiva de los genes esenciales para el crecimiento lítico en detrimento del ciclo lisogénico (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). También la cepa *Lb. casei* ATCC 393 posee en su genoma secuencias parcialmente homólogas a ISL1 (Shimizu-Kadota y col., 1988) y es lisógena para el fago ϕ AT3, el cual contiene a la secuencia de inserción (ISLC3) en su genoma (Lo y col., 2005).

En este trabajo **no fue posible obtener mutantes espontáneos resistentes a fagos**, a pesar de los numerosos intentos realizados con aplicación de variantes a las metodologías empleadas de rutina en el laboratorio, que sí resultaron efectivas con otras especies de bacterias lácticas (Quiberoni y col., 1999b; Binetti y col., 2003; Guglielmotti y col., 2006a). Ciertos hechos puntuales, azarosos y particulares observados a lo largo de esta Tesis y durante el análisis de las muestras provenientes de la industria en busca de fagos, nos incitaron a plantear la hipótesis de que la cepa comercial *Lb. paracasei* A, también sería lisógena. En diferentes y repetidas oportunidades se observaron **placas de lisis** aisladas en MRS-Ca agarizado conteniendo sólo a la **cepa sin infectar**, a partir de una de las cuales se purificó el fago pMLC-A. En dos situaciones independientes se observó la lisis de un cultivo de la cepa **sin infectar** en caldo MRS-Ca, aislando en el segundo evento al fago C_L. Varios fagos se aislaron de muestras de fermentos concentrados congelados de esta cepa, contenidos en envases sellados, aunque en estas muestras los resultados obtenidos en general no pudieron ser reproducidos, sugiriendo que el azar podría ser un factor de peso en esos casos. Además, el proceso de manufactura de este tipo de producto, al igual que para Yakult y a diferencia de una elaboración típica de yogur, involucra propagaciones celulares prolongadas en sistemas cerrados prácticamente estériles. De este modo, se aumentaría la

probabilidad de liberación espontánea de fagos si la cepa fuera lisógena y, por otro lado, la presencia de fagos en el ambiente se vuelve menos importante que en procesos más expuestos. La extraña inestabilidad hallada para las partículas fágicas existentes en las muestras enviadas por la industria, podrían probablemente relacionarse con las observaciones realizadas por Caso y col. (1995) para ciertos fagos temperados liberados de *Lb. plantarum*, que mostraron una marcada pérdida de viabilidad aún en presencia de compuestos protectores (albúmina, gelatina, glicerol) y a temperaturas de heladera.

A continuación, se describen comportamientos que fueron comunes a ambas cepas empleadas, *Lb. casei* ATCC 27139 y *Lb. paracasei* A, para obtener mutantes resistentes a los fagos J-1 y MLC-A. Se menciona como clones **pseudorresistentes** a aquéllos que evidenciaron una cierta resistencia frente a los fagos, a diferencia del comportamiento global mostrado por la cepa ancestral de la que derivaron:

- El desarrollo de colonias (para medio agarizado) o de turbidez (para cultivo secundario) en presencia de fagos fue de ocurrencia lenta (3 – 6 ds), sugiriendo que en la población celular la proporción de pseudorresistentes a los fagos sería baja.
- Sucesivos procesos de selección de clones pseudorresistentes, realizados en medio líquido, mostraron una disminución en los tiempos necesarios para lograr enturbiamiento de los cultivos lisados (datos no mostrados). Parecía que, al igual que al atravesar un tamiz, la muestra se va enriqueciendo en componentes más pequeños al disminuir el diámetro de la malla hasta seleccionar al más pequeño buscado; en nuestro caso con las sucesivas selecciones y el enriquecimiento en pseudorresistentes, llegaría una instancia de recuperación de algún resistente verdadero y estable. Sin embargo, esto no fue posible en nuestro caso.
- Los mutantes pseudorresistentes obtenidos sólo fueron estables cuando los fagos empleados para lograr ese fenotipo, coexistían continuamente con el cultivo. Es decir, que si los mutantes se “lavaban de fagos”, en general las células volvían a ser sensibles frente al mismo, como si el fenotipo de fago resistencia fuera **inducido por la presencia**

del fago. Por eso, los clones que se mostraban resistentes y cuya estabilidad era evaluada por presión con altas concentraciones de fago, superaban fácilmente el ensayo. En cambio, con la aplicación del nuevo criterio de estabilidad, si la resistencia de la cepa es inducida por el fago, con los sucesivos repiques éste se va diluyendo al no poder propagarse y no puede inducir más resistencia. De modo que si la cepa aún se mostrara resistente, el fenotipo sería independiente de la presencia del fago. Ninguno de los clones superó el segundo criterio de estabilidad aplicado.

Con todos estos comportamientos atípicos con relación a otras bacterias lácticas estudiadas en el laboratorio, pero comunes y repetidos para las cepas investigadas en este trabajo, y con los siguientes elementos:

- la lisogenia se encuentra ampliamente distribuida en lactobacilos y es muy frecuente en *Lb. casei* / *paracasei* (Sakurai y col., 1970; Séchaud y col., 1988; Davidson y col., 1990)
- la existencia de secuencias de inserción (Shimizu-Kadota y col., 1985; Shimizu-Kadota y col., 1988; Lo y col., 2005)
- la asociación entre la secuencia de inserción ISL1 y la generación de fagos virulentos ϕ FSVs derivados del profago ϕ FSW (Shimizu-Kadota y col., 1985)
- la liberación espontánea del profago ϕ FSW del cromosoma de la cepa lisógena *Lb. casei* ATCC 27139 (Shimizu-Kadota y Sakurai, 1982)

se plantean las siguientes hipótesis:

- Al igual que en el caso de *Lb. casei* ATCC 27139, una secuencia de inserción podría estar presente en *Lb. paracasei* A y dar lugar a la generación de fagos virulentos a partir de un profago integrado a su cromosoma.
- Estos fagos virulentos mutantes derivados del profago podrían ir evolucionando en el ambiente industrial y dar lugar a una familia de fagos similares, pero no idénticos entre sí.
- Mientras la población de partículas fágicas y células permanecen en contacto por largo tiempo (según la metodología de obtención de mutantes), los fagos infectarían el cultivo. Aunque probablemente la mayoría proseguiría el ciclo lítico, una pequeña proporción de fagos podría lisogenizar algunas células y éstas serían capaces de desarrollar y producir turbidez luego de varios días en el tubo del cultivo lisado. La presencia del profago en su cromosoma haría que se muestren resistentes frente al fago virulento homólogo (inmunidad a la superinfección). Sin embargo, y una vez eliminadas las partículas fágicas presentes en el medio, la lisogenia se revertiría y los clones pseudoresistentes se volverían nuevamente sensibles al fago original. Tal vez las secuencias de inserción podrían jugar un rol importante en este evento. Sería una explicación para la existencia (en un cultivo monocepa) de diferentes sensibilidades frente a un fago, que permitiría la instalación de un estado portador de fagos (*phage-carrier state*).

En bacterias lácticas, se describieron casos de coexistencia de partículas fágicas activas y cultivos monocepa, para *Leuconostoc oenos* 58N (Arendt y col., 1990) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Se considera que el estado portador de fagos, que puede definirse como la presencia continua en un balance metaestable de fagos virulentos durante el crecimiento del cultivo hospedador, contribuiría a los elevados niveles de fago resistencia encontrados en algunos cultivos iniciadores (Klaenhammer y

Fitzgerald, 1994). En un trabajo llevado a cabo por Renoux y Suire (1963) con cultivos de *Brucella*, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con mutantes pseudoresistentes para ambas cepas estudiadas en esta Tesis. Se obtuvieron placas de lisis individuales diseminadas en un césped homogéneo del cultivo puro (S) y el número de esas placas se aumentaba si se trataba con su propio sobrenadante de cultivo a la suspensión celular. Eventualmente, sobre las placas de lisis se obtuvo un desarrollo secundario del cultivo (en nuestro caso los potenciales resistentes) alrededor del cuarto día de incubación y al subcultivarlo, el crecimiento resultante era otra vez un césped homogéneo con placas diseminadas (SI). Igualmente, la mayoría de nuestros potenciales resistentes revirtieron el fenotipo lisando en el primer repique de sensibilidad. Estudiando varios tipos de colonias diferentes de los cultivos de *Brucella* se halló que tanto S como SI eran sensibles al agente lítico obtenido en el filtrado del cultivo y que cuando el fago infectaba, las bacterias podían lisar o desarrollar como colonias resistentes. Éstas últimas, fueron siempre portadoras de fagos activos contra S y SI, por lo que se denominaron P. De la propagación de células del tipo P, podían surgir nuevas bacterias P o células sensibles al fago (S ó SI). Además, y si bien no se explica la causa, todos los stocks de cultivos de *Brucella* contenían partículas fágicas. Los cambios fenotípicos a colonias P resistentes y portadoras de fagos pueden ser una explicación para la supervivencia de las células en presencia de fagos (*phage carrier state*). Cuando naturalmente en ese ambiente ocurre una infección fágica, las células P aparecen probablemente en respuesta a la presencia del fago. Son capaces de originar nuevas colonias P, S ó SI. Y nuevas células P pueden surgir por acción de los fagos liberados (progenie), sobre nuevas células S ó SI. A su vez, S y SI pueden dar origen al mismo tipo de célula o por infección con el fago lisar y otras transformarse en P (Renoux y Suire, 1963). Así en presencia del fago se favorecería el enriquecimiento de la población en células resistentes. Un fenómeno similar podría explicar en gran medida los comportamientos atípicos hallados con nuestros mutantes.

Si se considera la evolución desde fines de 2003, con el aislamiento del primer fago argentino específico de una cepa probiótica, hasta la actualidad, con más de 20 aislamientos

realizados, se destaca que a partir de mediados de 2005 la presencia de fagos en la planta ha ido creciendo en forma progresiva y continua. Es notable además, el aumento en el número y diversificación de muestras y en la frecuencia de los envíos para la detección de fagos, todos indicativos de la preocupación real y creciente respecto de este problema por parte de la industria.

Estudios preliminares de sus perfiles de restricción, indican que los dos primeros fagos aislados son diferentes entre sí y del resto (hasta MLC-A6 e incluyendo pMLC-A). En estudios posteriores se plantea investigar la evolución de estos fagos en la planta, así como también sus características.

Los estudios desarrollados en esta Tesis muestran la aparición para la industria láctea de un nuevo problema cuya resolución es compleja y difiere respecto de los ataques fágicos sobre otras bacterias lácticas. En el caso de probióticos las estrategias de rotación de cultivos no son posibles pues cada cepa es única, la obtención de BIMs es prácticamente muy difícil, cobrando importancia los tratamientos con agentes de limpieza, pero que también son ineficientes en el caso de que los fagos provengan desde el interior de la misma cepa probiótica empleada en la fermentación.

CONCLUSIONES

V CONCLUSIONES

La industria láctea es particularmente susceptible al ataque por bacteriofagos, por lo cual se ha generado un vasto caudal de conocimientos para fagos de distintas especies de bacterias lácticas en general y, particularmente, de lactococos. Por el contrario, la información disponible para fagos de bacterias probióticas es escasa, debido a la aparición más reciente de este problema. Desafortunadamente, la intensificación y diversificación en el uso de este tipo de bacterias ha ocasionado en los últimos tiempos, incrementos en los accidentes por fagos, con el agravante de que se cuenta con un elenco acotado de estas cepas únicas por sus propiedades y comercialmente muy valiosas.

En nuestro trabajo se abordó el estudio de fagos de *Lb. casei* / *paracasei* encontrándose, en sus características y comportamientos, ciertas similitudes con respecto a fagos de otras especies previamente estudiados, así como también diferencias sustanciales que hacen que estos fagos, al igual que sus cepas sensibles, sean singulares.

En general y en cuanto a las similitudes, se pueden mencionar: su inclusión en la Familia *Siphoviridae*, los tamaños de sus genomas, sus viabilidades frente a diferentes factores como biocidas, tratamientos térmicos (si bien, resultaron más resistentes frente al hipoclorito de sodio y a pH extremos y en algunos casos se observaron resistencias térmicas extraordinarias) y durante el almacenamiento, y la naturaleza hidrocarbonada de sus receptores. Por otro lado, se observaron ciertos comportamientos particulares como la existencia de un perfil de cepas sensibles único (entre 47 cepas empleadas) para los 7 fagos estudiados, la capacidad de un fago de mostrar comportamientos considerablemente diversos al infectar distintas cepas (como se vio en los ensayos de adsorción, tanto sobre célula entera como sobre paredes, y en los parámetros de multiplicación fágica). En este sentido, el ejemplo más notable fue el del fago PL-1 y *Lb. paracasei* A. Además, las diferencias obtenidas en las adsorciones fágicas sobre células calentadas y no, considerando que el proceso no dependía de la viabilidad celular, fueron eventos diferenciales con respecto a otros sistemas estudiados por nuestro grupo de trabajo. Así como también, la incapacidad de inactivación de los fagos por parte de monosacáridos constituyentes del

receptor, que hicieron inútiles a las técnicas empleadas de rutina en el laboratorio y requirieron de nuevos diseños (ensayos de competencia y desorción).

Durante el desarrollo de esta Tesis fue posible aislar al primer fago específico de *Lb. paracasei* de Sudamerica (MLC-A), demostrándose sus diferencias genómicas y fenotípicas por comparación con los fagos de colección. Posteriormente, en el período comprendido entre julio de 2005 y agosto de 2006, se realizaron más de 20 aislamientos a partir de muestras provenientes de la misma industria, indicando la aparición más frecuente de fallas en las fermentaciones, así como también la preocupación creciente respecto del problema por parte de la industria. Esos nuevos fagos aislados y purificados se depositaron en la colección del INLAIN, y si bien se comenzó una caracterización muy preliminar de alguno de ellos, constituyen una base de material de estudio para trabajos posteriores (caracterización propia de cada fago, análisis de diversidad y evolución de los fagos en un ambiente industrial).

Con relación a los resultados del aislamiento de mutantes espontáneos fago resistentes, se encontraron comportamientos muy diferentes comparando con fagos de otras especies de bacterias lácticas. Si bien no es posible concluir en forma definitiva, sí se pueden plantear ciertas observaciones por ser muy novedosas y por ser potencial fundamento de investigaciones futuras:

- El porcentaje de mutantes pseudorresistentes en la población celular es muy bajo e iría en aumento a lo largo de sucesivos procesos de selección de estos clones.
- El fenotipo de resistencia a fagos parecería ser inducido por la presencia de los mismos en el medio. Éste hecho obligó a modificar las técnicas empleadas para evaluar la estabilidad de los clones resistentes a fagos.
- La lisogenia, y probablemente la existencia de secuencias de inserción, podrían jugar un rol fundamental en la imposibilidad de obtención de mutantes fago resistentes estables en *Lb. casei* / *paracasei*.

Hasta el momento, se ha conocido a los fagos en un papel negativo frente a los procesos fermentativos y se han buscado infinidad de estrategias para minimizar su accionar. Estas estrategias, en su mayoría, no son de fácil implementación en el caso de cultivos probióticos, como se ha mencionado ya en repetidas oportunidades. Además, y considerando las singularidades que presentan algunas interacciones fago - cepa en estos casos, probablemente sea necesario intentar contemplar el problema desde otra óptica, de modo de comprender las reglas que rigen tales comportamientos. Tal vez, pueda descifrarse el modo en que cepa y fago coexisten en ciertos ecosistemas y encontrar la manera de inclinar la balanza hacia un estado favorable para lograr una fermentación exitosa.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Accolas, J.-P. y Spillmann, H. (1979). Morphology of bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus helveticus*. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 309 - 319.

Ackermann, H.W. (2004). Comunicación personal.

Ackermann, H.W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief Review. *Arch. Virol.* 146: 843 - 857.

Ackermann, H.W. (2005). Bacteriophages. Biology and applications. Cap. 4: Bacteriophage classification. (Kutter, E. y Sulakvelidze, A.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 67-89.

Ackermann, H.W. y Dubow, M. S. (1987). Viruses of prokaryotes. Vol. II. Natural group of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton, FL.

Ackermann, H.W.; Cantor, E.D.; Jarvis, A.W.; Lembke J. y Mayo, J.A. (1984). New species definitions in phages of gram positive cocci. *Intervirology* 22: 181 - 190.

Alatossava, T. y Klaenhammer, T.R. (1991). Molecular characterization of three small isometric-headed bacteriophages which vary in their sensitivity to the lactococcal phage resistance plasmid pTR2030. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(5): 1346 - 1353.

Alatossava, T.; Forsman, P.; Mikkonen, M.; Räsänen, L. y Vasala, A. (1998). Molecular genetics and evolution of *Lactobacillus* phage LL-H and its related phages. *Recent Res. Devel. In Agricultural and Biological Chem.* 2: 345 - 360.

Alvarez, M. A.; Rodríguez, A. y Suárez, J. E. (1999). Stable expression of the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 repressor blocks phage propagation during milk fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 86: 812 - 816.

Arendt, E.K.; Neve, H. y Hammes, W.P. (1990). Characterization of phage isolates from a phage-carrying culture of *Leuconostoc oenos* 58N. *Appl. Microbiol. Biot.* 34(2): 220 - 224.

Arendt, E.K.; van de Guchte, M.; Coffey, A.G.; Daly, C. y Fitzgerald, G.F. (1993). Molecular genetics of bacteriophages of lactic acid bacteria. *Lait* 73: 191 - 198.

Auad, L.; Ruiz Holgado, A.A.P.; Forsman, P.; Alatosava, T. y Raya, R.R. (1997). Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* temperate bacteriophage. *J. Dairy Sci.* 80 (11): 2706 - 2712.

Bassel, A.; Shaw, M. y Campbell, L.L. (1971). Dissociation by chelating agents and substructure of the thermophilic bacteriophage TP84. *J. Virol.* 7(5): 663 - 672.

Beresford, T.P. (2003). *Dairy Processing. Improving Quality. Cap.20: Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality.* (Smit, G.) Woodhead Publishing Limited y CRC Press LLC, Cambridge, England. 448 - 469.

Beresford, T.P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N.L. y Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology *Int. Dairy J.* 11: 259 - 274.

Binetti, A.; Suárez, V.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J. (2003). Mutantes espontáneos de *Streptococcus thermophilus* resistentes a fagos autóctonos para procesos industriales. *Rev. Arg. de Lactología* 22: 77 - 96.

Binetti, A.G. (2001). Bacteriofagos autóctonos de *Streptococcus thermophilus* aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fago resistentes. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química.

Binetti, A.G. y Reinheimer, J.A. (2000). Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J. Food Prot.* 63: 509 - 515.

Binetti, A.G.; Del Río, B.; Martín, M.C. y Alvarez, M. (2005). Detection and characterization of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10): 6096 - 6103.

Binetti, A.G.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J.A. (2002). Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Res. Int.* 35: 73 - 83.

Birge, E.A. (1994). Bacterial and bacteriophage genetics. Cap. 6: T4 bacteriophage as a model genetic system. (Birge, E.A.). Springer-Verlag New York, Inc. New York, USA. 137-173.

Bolondi, A.; Gaggino, O. y Monesiglio, J. (1995). Microscopía electrónica: técnicas generales. (Unidad de Microscopía Electrónica y Bioquímica Aplicada del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias). INTA - Castelar, Argentina.

Bomba, A.; Nemcová, R.; Mudroňová, D. and Guba, P. (2002). The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 13: 121 - 126.

Boucher, I. y Moineau, S. (2001). Phages of *Lactococcus lactis*: an ecological and economical equilibrium. *Recent Research Devel. Virol.* 3: 243 - 256.

Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 32(4): 230 - 314.

Brussow, H. (2001). Phages of dairy bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 283 - 303.

Brussow, H. y Kutter, E. (2005). Bacteriophages. Biology and applications. Cap. 6: Phage Ecology. (Kutter, E. y Sulakvelidze, A.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.E.U.U. 129 - 163.

Brussow, H.; Bruttin, A.; Desiere, F.; Lucchini, S. y Foley, S. (1998). Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages - a Review. *Virus Genes* 16 (1): 95 - 109.

Callegari, M.L. (1992). Tesis para obtener el Título de Dottore de Ricerca della Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia.

Capra, M. L.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J.A. (2004). Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 499 - 504.

Capra, M. L.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J.A. (2006a). Phages of *Lactobacillus casei/paracasei*: Response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *J. Appl. Microbiol.* 100: 334 - 342.

Capra, M.L.; Quiberoni, A.L.; Ackermann, H.W.; Moineau, S. y Reinheimer, J.A. (2006b). Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*. *J. Dairy Sci.* 89(7): 2414 - 2423.

Carlson, K. (2005). Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches. Appendix en *Bacteriophages. Biology and applications.* (Kutter, E. y Sulakvelidze, A.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.E.U.U. 437 - 494.

Carminati, D.; Zennaro, R.; Neviani, E.; Giraffa, G. (1993). Selezioni e caratteristiche di mutanti fago-resistenti de *Lactobacillus helveticus*. *Ciencia e Técnica Lattiero-Casearia* 44 (1): 33 - 48.

Caso, J.L.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Herrero, M.; Montilla, A.; Rodríguez, A. y Suárez, J.E. (1995). Isolation and characterization of temperate and virulent bacteriophages of *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* 78: 741 - 750.

Chandan, R. C. (1999). Enhancing market value of milk by adding cultures. *J. Dairy Sci.* 82: 2245 - 2256.

Charteris, W. P.; Kelly, P. M.; Morelli, L. y Collins, J. K. (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.* 51 (4): 123 - 136.

Chow, J.J.; Batt, C.A. y Sinskey, A.J. (1988). Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* ch2. Appl. Environ. Microbiol. 54(5): 1138 - 1142.

Cluzel, P.-J.; Meaux, M.; Rousseau, M. y Accolas, J.-P. (1987). Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. J. Dairy Res. 54: 397 - 405.

FAO/OMS (2001). Consulta de expertos sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Córdoba Argentina 1 - 4 octubre de 2001.

Curry, B. y Crow, V. (2002). *Lactobacillus casei* group. en Encyclopedia of Dairy Sciences. (Roginski, H.; Fuquay, J.W. y Fox P.F.). Academic Press Elsevier Science, Cornwall, UK. 1488 - 1494.

Daoust, D.R.; El-Bisi, H.M. y Litsky, W. (1965). Thermal destruction kinetics of a lactic streptococcal bacteriophage. Appl. Microbiol. 13: 478 - 485.

Das, N.K. y Marshall, R.T. (1967). Effects of supplemental calcium or calcium-binding agents on staphylococcal bacteriophage proliferation in skim milk. Appl. Microbiol. 15 (6): 1479 - 1482.

Davidson, B.E.; Powell, I.B. y Hillier, A. (1990). Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 87: 79 - 90.

de Ambrosini, V.M.; Gonzales, S.; Perdigón, G.; de Ruiz Holgado, A.P.; Oliver, G. (1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44(12): 2263 - 2267.

Delcour, J.; Ferain, T.; Deghorain, M.; Palumbo, E. y Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 76: 159-184.

Dellaglio, F.; Felis, G.E. y Torriani, S. (2002). The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla - Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al 1989.

Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 285 - 287.

Dinsmore, P.K. y Klaenhammer, T.R. (1995). Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. A review. *Mol. Biotechnol.* 4: 297 - 314.

Djordjevic, G.M.; O'Sullivan, D.J.; Walker, S.A.; Conklin, M.A. y Klaenhammer, T.R. (1997). A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *J. Bacteriol.* 179(21): 6741 - 6748.

Dobson, C.M.; Chaban, B.; Deneer, H. y Ziola, B. (2004). *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus zeae* isolates identified by sequence signature and immunoblot phenotype. *Can. J. Microbiol.* 50 (7): 482 - 488.

Dunne, C.; Murphy, L.; Flynn, S.; O'Mahony, L.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Morrissey, D.; Thornton, G.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G.C.; Shanahan, F. y Collins, K. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animals models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 279 - 292.

Everson, T.C. (1991). Control of phages in the dairy plant. *FIL-IDF bulletin* 263, 4 - 11.

Fabrizio, S.V.; Ledford, R.A. y Parada, J.L. (1999). Heat resistance of *Lactococcus lactis* bacteriophages. *Microbiol. aliment. nutr.* 17: 191 - 198.

Farnworth, E. (2003). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Cap. 15: The future for fermented foods. (Farnworth, E. R.). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, EEUU. 361 - 378.

Fioramonti, J.; Theodorou, V. y Bueno, L. (2003). Probiotics: what are they? What are there effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17(5): 711 - 724.

Fooks, L.J.; Fuller, R. y Gibson, G.R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* 9: 53 - 61.

Forde, A. y Fitzgerald, G.F. (1999). Bacteriophage defense systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 89 - 113.

Forsman, P.; Tanskanen, J. y Alatossava, T. (1993). Structural similarity and genetic homology between *Lactobacillus casei* bacteriophages isolated in Japan and in Finland. *Biosc. Biotech. Biochem.* 57: 2043 - 2048.

Foschino, R.; Lombarda, F.; Scarpellini, M.; Galli, A. (1996). Relationship between virulent bacteriophage BU77-B1 and temperate bacteriophage OFE3 of *Lactobacillus fermentum*. *Microbiol. Aliment. Nutr.* 14: 339 - 349.

Foschino, R.; Perrone, F. y Galli, A. (1995). Characterization of two *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 677 - 683.

Frank, J.F. y Hassan, A.N. (1998). *Applied Dairy Microbiology*. Cap. 6: Starter cultures and their use. (Marth, E.H. y Steele, J.L.). Marcel Dekker Inc. New York, USA. 131 - 172.

Fremaux, C.; De Antoni, G.L.; Raya, R.R. y Klaenhammer, T.R. (1993). Genetic organization and sequence of the region encoding integrative functions from *Lactobacillus gasseri* temperate bacteriophage ϕ adh. *Gene* 126: 61 - 66.

García, P.; Bascarán, V.; Rodríguez, A.; Suárez, J.E. (1997). Isolation and characterization of promoters from the *Lactobacillus casei* temperate bacteriophage A2. *Can. J. Microbiol.* 43: 1063 - 1068.

García, P.; Ladero, V.; Alonso, J.C. y Suárez, J.E. (1999). Cooperative interaction of CI protein regulates lysogeny of *Lactobacillus casei* by bacteriophage A2. *J. Virol.* 73(5): 3920 - 3929.

Gilliland, S. E. (1998). Fermented milks and probiotics. En: *Applied Dairy Microbiology*. (Marth E.H. y Steel J.L.). Marcel Dekker Inc, New York USA, 195 - 212.

Guarner, F. y Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. Short communication. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 237 - 238.

Guarner, F.; Perdigón, G.; Corthier, G.; Salminen, S.; Koletzko, B. y Morelli, L. (2005). Should yogurt cultures be considered probiotic? *Brit. J. Nutr.* 93: 783 - 786.

Gueimonde, M. y Salminen, S. (2002). Probiotic and intestinal microbiota. *Functional Foods Forum*. University of Turku, Finland. I Simposio Argentino - Italiano: "Bacterias Lácticas. Aplicación en alimentos y salud" (publicado en CD).

Guglielmotti, D.M.; Reinheimer, J.A.; Binetti, A.G.; Giraffa, G.; Carminati, D. y Quiberoni, A. (2006a). Characterization of spontaneous phage-resistance derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* commercial strains. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 126 - 133.

Guglielmotti, D.M. (2003). Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles. Tesis presentada para acceder al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.

Guglielmotti, D.M.; Briggiler Marcó, M.; Golowczyc, M.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni A. del L. (2006b). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int. Dairy J.* (en prensa).

Guttman, B.; Raya, R. y Kutter, E. (2005). *Bacteriophages. Biology and applications*. Cap. 3: Basic phage biology. (Kutter, E. y Sulakvelidze, A.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.E.U.U. 29 - 66.

Hall, E.A. y Knox, K.W. (1965). Properties of the polysaccharide and mucopeptide components of the cell wall of *Lactobacillus casei*. *Biochem. J.* 96: 310 - 318.

Hammer, B.W. y Bohel, F. (1957). *Bacteriology of lactic cultures. Bacteriophages. Dairy Bacteriology*. 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc. NY.

Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1992). Probiotics: A general view. En: *The Lactic acid bacteria in health and disease*. (Wood, B.J.B.). Elsevier Applied Science, London, England, 151 - 170.

Heap, H.A. y Harnett, J.T. (2002). Encyclopedia of Dairy Sciences. Bacteriophage in the Dairy Industry. (Roginski, H.; Fuquay J.W. y Fox P.F.). Academic Press Elsevier Science, Cornwall, UK. 136 - 141.

Heaton, M.P. y Neuhaus, F.C. (1994). Role of the D-alanyl carrier protein in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid. J. Bacteriol. 176(3): 681 - 690.

Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: products characteristics and starter organisms. Am. J. Clin. Nutr. 73(2): 374S - 379S.

Helvoort, T.V. (1996). When did virology start? Features ASM News 63(3): 142 - 145.

Herrero, M.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Caso, J.L. y Suárez, J.E. (1994). Characterization of ϕ 393-A2, a bacteriophage that infects *Lactobacillus casei*. Microbiology 140: 2585 - 2590.

Hiatt, C.W. (1964). Kinetics of the inactivation of viruses. Bacteriol. Rev. 28: 150-163.

Hicks, C.L. y Suriawan, I. (2002). Inhibition of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* m13 and c2 bacteriophage proliferation by chelation of Ca^{2+} with monosodium glutamate. 2002 Joint Meeting, July 21-25, Québec City, Canada.

Hill, C. 1993. Bacteriophages and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 12: 87 - 108.

Hill, C. y Fitzgerald, G.F. (1996). Dairy Starter Cultures. Cap. 10: Future prospects for culture improvement. (Cogan, T.M. y Accolas, J.P.). VCH Publishers, Inc. New York, USA. 249 - 260.

Hughes, D.B. y Hoover, D.G. (1995). Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. J. Dairy Sci. 78: 268 - 276.

IDF (International Dairy Federation). (1992). New technologies for fermented dairy products. Bulletin N° 277/1992.

IDF (International Dairy Federation). (1999). Cultured and culture-containing dairy products in health. Commission F – Dairy Science, Nutrition and Education. Annual Sessions in Athens (Greece), 15 – 18 September 1999.

Ishibashi, K.; Takesue, S. y Watanabe, K. (1980). Effect of some lectins on the adsorption of PL-1 phage to *Lactobacillus casei*. *Agirc. Biol. Chem.* 44 (7): 1689 - 1691.

Ishibashi, K.; Takesue, S.; Watanabe, K. y Oishi, K. (1982). Use of lectins to characterize the receptors sites for bacteriophage PL-1 of *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2251 - 2259.

Jarvis, A.W. (1989). Bacteriophages of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 72: 3406 - 3428.

Josephsen, J. y Neve, H. (1998). Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Cap. 14: Bacteriophages and lactic acid bacteria. (Salminen, S. y von Wright, A). Marcel Dekker Inc., New York, USA. 385 - 436.

Kailasapathy, K. y Ribka, S. (1997). *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* ssp. – their therapeutic potential and survival in yogurt. *Aust. J. Dairy Technol.* 52: 28 - 33.

Kalantzopoulos, G. (1997). Fermented products with probiotic qualities. *Anaerobe* 3: 185 - 190.

Kashige, N.; Kakita, Y.; Nakashima, Y.; Miake, F. y Watanabe, K. (2001). Mechanism of the photocatalytic inactivation of *Lactobacillus casei* phage PL-1 by titania thin film. *Curr. Microbiol.* 42: 184 - 189.

Kashige, N.; Nakashima, Y.; Miake, F. y Watanabe, K. (2000). Cloning, sequence analysis, and expression of *Lactobacillus casei* phage PL-1 lysis genes. *Arch. Virol.* 145: 1521 - 1534.

Klaenhammer, T.R. (1984). Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. *Adv. Appl. Microbiol.* 30: 1 - 29.

Klaenhammer, T.R. y Fitzgerald, G.F. (1994). Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Cap. 3: Bacteriophages and bacteriophage resistance. (Gasson y de Vos). Blackie Academic & Professional. Glasgow, UK. 106 - 168.

Klaenhammer, T.R. y Kullen, M. J. (1999). Selection and design of probiotics. Int. J. Food Microbiol. 50: 45 - 57.

Knox, K.W. y Brandsen, J. (1962). The isolation of components from the cell wall of *Lactobacillus casei*. Biochem. J. 85: 15 - 23.

Knox, K.W. y Hall, E.A. (1965a). The isolation of oligosaccharides from the cell-wall polysaccharide of *Lactobacillus casei*, serological group C. Biochem. J. 94: 525 - 533.

Knox, K.W. y Hall, E.A. (1965b). The linkage between the polysaccharide and mucopeptide components of the cell wall of *Lactobacillus casei*. Biochem. J. 96: 302 - 309.

Kutter, E.; Raya, R. y Carlson, K. (2005). Bacteriophages. Biology and applications. Cap. 7: Molecular mechanisms of phage infection. (Kutter, E. y Sulakvelidze, A.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.E.U.U. 165 - 222.

Ladero, V.; García, P.; Alonso, J.C. y Suárez, J.E. (1999). A2 Cro, the lysogenic cycle repressor, specifically binds to the genetic switch region of *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. Virol. 262: 220 - 229.

Ladero, V.; García, P.; Basarán, V.; Herrero, M.; Alvarez, M. y Suárez, J. (1998). Identification of the repressor-encoding gene of the *Lactobacillus* bacteriophage A2. J. Bacteriol. 180(13): 3474 - 3476.

Leahy, S.C.; Higgins, D.G.; Fitzgerald, G.F. y van Sinderen, D. (2005). A review. Getting better with bifidobacteria. J. Appl. Microbiol. 98: 1303 - 1315.

Lee, A.; Eschenbruch, R. y Waller, J. (1985). Effect of phenolic compounds, ethyl alcohol, and sodium metabisulphite on the lytic activity of phage PL-1 on a *Lactobacillus casei* S strain. Can. J. Microbiol. 31: 873 - 875.

Lee, Y.K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S.L. (1999). Handbook of probiotics. Cap. 1: Introduction. (Lee, Y.K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S.L.). John Wiley & Sons Inc., New York, USA. 1 - 22.

Lillehaug, D. (1997). An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. *J. Appl. Microbiol.* 83: 85 - 90.

Limsowtin, G.K.Y. y Terzaghy, B.E. (1976). Phage resistant mutants: their selection and use in cheese factories. *New Zeal. J. Dairy Sci.* 11: 251 - 256.

Lo, T.C.; Shih, T.C.; Lin, C.F.; Chen, H.W. y Lin, T.H. (2005). Complete genomic sequence of the temperate bacteriophage ϕ AT3 isolated from *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Virology* 339: 42 - 55.

Lu, Z.; Altermann, E.; Breidt, F.; Predki, P.; Fleming, H.P. y Klaenhammer, T.R. (2005). Sequence analysis of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage ϕ JL-1. *Gene* 348: 45 - 54.

Lu, Z.; Breidt, Jr.F.; Fleming, H.P.; Altermann, E. y Klaenhammer, T.R. (2003). Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ϕ JL-1, from a cucumber fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 225 - 235.

Maillard, J.Y.; Beggs, T.S.; Day, M.J.; Hudson, R.A. y Russell, A.D. (1996a). The effect of biocides on proteins of *Pseudomonas aeruginosa* PAO bacteriophage F116. *J. of Appl. Bacteriol.* 80: 291 - 295.

Maillard, J.Y.; Beggs, T.S.; Day, M.J.; Hudson, R.A. y Russell, A.D. (1996b). Damage to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteriophage F116 DNA by biocides. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 540 - 544.

Maillard, J.Y.; Hann, A.C.; Baubet, V. y Perrin, R. (1998). Efficacy and mechanisms of action of sodium hypochlorite on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 phage F116. *J. Appl. Microbiol.* 85: 925 - 932.

Marcos, A.; Warnberg, J.; Nova, E.; Gomez, S.; Alvarez, A.; Alvarez, R.; Mateos, J.A. y Cobo, J.M. (2004). The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN – 114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur. J. Nutr.* 43 (6): 381 – 389.

Mata, M. y Ritzenthaler, P. (1988). Present state of lactic acid bacteria phage taxonomy. *Biochimie* 70: 395 – 399.

Matsuguchi, T.; Takagi, A.; Matsuzaki, T.; Nagaoka, M.; Ishikawa, K.; Yokokura, T. y Yoshikai, Y. (2003). Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through toll-like receptor 2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(2): 259 – 266.

Matsuzaki, T. (2003). Handbook of Fermented Functional Foods. Cap. 6: Health properties of milk fermented with *Lactobacillus casei* strain Shirota (LcS). (Farnworth, E.R.). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, EEUU. 145 – 175.

McGrath, S.; Fitzgerald, G.F. y van Sideren, D. (2004). The impact of bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 94 – 99.

McGrath, S.; van Sinceren, D. y Fitzgerald, G.F. (2002). Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12: 3 – 15.

Medici, M.; Vinderola, C.G.; Weill, R. y Perdigón, G. (2005). Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *J. Dairy Res.* 72: 243 – 249.

Medici, M.; Vinderola, C.G.; Perdigón, G. (2004). Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *Int. Dairy J.* 14 (7): 611 – 618.

Moineau, S. (1999). Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* 76: 377 – 382.

Moineau, S. y Lévesque, C. (2005). Bacteriophages: Biology and Applications. Cap. 10: Control of bacteriophages in industrial fermentations. (Kutler, E. y Sulakvelidze, A.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.E.U.U. 285 - 296.

Moineau, S.; Pandian, S. y Klaenhammer, T.R.. (1994). Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1832 - 1841.

Moineau, S.; Tremblay, D. y Labrie, S. (2002). Phages of lactic acid bacteria: from genomics to industrial applications. ASM News 68(8): 388 - 393.

Moscoso, M. y Suárez, J.E. (2000). Characterization of the DNA replication module of bacteriophage A2 and use of its origin of replication as a defense against infection during milk fermentation by *Lactobacillus casei*. Virology 273: 101 - 111.

Nakashima, Y.; Hasuwa, H.; Kakita, Y.; Murata, K.; Kuroiwa, A.; Miake, F. y Watanabe, K. (1998). A temperate phage with cohesive ends induced by mitomycin C treatment of *Lactobacillus casei*. Arch. Virol. 143: 1621 - 1626.

Nakashima, Y.; Ikeda, H.; Kakita, Y.; Miake, F. y Watanabe, K. (1994). Restriction map of the genomic DNA of *Lactobacillus casei* bacteriophage PL-1 and nucleotide sequence of its cohesive single-stranded ends. J. Gen. Virol. 75: 2537 - 2541.

Nes, I.F.; Brendehaug, J. y von Husby, K.O. (1988). Characterization of the bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Biochimie 70: 423 - 427.

Neve, H. (1996). Dairy Starter Cultures. Cap. 6: Bacteriophage. (Cogan, T.M. y Accolas, J.P.). VCH Publishers, Inc. New York, USA. 157 - 190.

Neve, H. y Teuber, M. (1991). Basic microbiology and molecular biology of bacteriophages of lactic acid bacteria in dairies. En Bulletin FIL-IDF N° 263. Cap. 1.

Neviani, E.N.; Carminatti, D. y Giraffa, G. (1992). Selection of some bacteriophage- and lisozyme-resistant variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. J. Dairy Sci. 75: 905 - 913.

Nielsen, E.W. (1998). Long term use of a Cheddar starter and development of phages with homology to its bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 1003 - 1009.

Nousisinen, J. y Setälä, J. (1998). Lactic acid bacteria as animal probiotics. En: *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects.* (Salminen, S. y von Wright A.). Marcel Dekker Inc., New York, USA, 437 - 473.

Ouwehand, A. C.; Bianchi Salvadori, B.; Fondén, R.; Mogensen, G.; Salminen, S. y Sellars, R. (2003). Health effects of probiotics and culture - containing dairy products in humans. En *Health Effects of Fermented Dairy Products. Bulletin of the IDF* 380.

Ouwehand, A. C.; Kirjavainen, P. V.; Shortt, C. y Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9: 43 - 52.

Ouwehand, A. C.; Salminen, S. y Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 279 - 289.

Parada, J.L. (1995). Fagos de bacterias lácticas y estrategias para su control. *Tecnología Láctea Latinoamericana* 2: 38 - 43.

Pedone, C.A.; Arnaud, C.C.; Postaire, E.R.; Bouley, C.F. y Reinert, P. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int. J. Clin. Pract.* 54(9): 568 - 571.

Pedone, C.A.; Bernabeu, A.O.; Postaire, E.R.; Bouley, C.F. y Reinert, P. (1999). The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN 114001) on acute diarrhoea in children attending day care centres. *Int. J. Clin. Pract.* 53(3): 179 - 184.

Perdigón, G.; Fuller, R. y Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2(1): 27 - 42.

Perdigón, G.; Vintini, E.; Alvarez, S.; Medina, M. y Medici, M. (1999). Study of the possible mechanism involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 82(6): 1108 - 1114.

Playne, M.J.; Bennet, L.E. y Smithers, G.W. (2003). Functional dairy foods and ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.* 58(3): 242 - 264.

Quiberoni, A. del L. (1997). Interacción de bacterias lácticas termófilas con bacteriofagos específicos. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química.

Quiberoni, A. y Reinheimer, J.A. (1998). Physicochemical characterization of phage adsorption to *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 cells. *J. Appl. Microbiol.* 85: 762 - 768.

Quiberoni, A.; Auad, L.; Binetti, A.G.; Suárez, V.B.; Reinheimer, J.A. y Raya, R.R. (2003b). Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yogurt industrial plant. *Food Microbiol.* 20: 461 - 469.

Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. y Reinheimer, J.A. (2003a). Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 51 - 62.

Quiberoni, A.; Reinheimer, J.A. y Suárez, V.B. (1999b). Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage-resistant mutants in hard cheese production. *Int. Dairy J.* 8: 941 - 949.

Quiberoni, A.; Stiefel, J.I. y Reinheimer, J.A. (2000). Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cells obtained by a simple protocol. *J. Appl. Microbiol.* 89: 1059 - 1065.

Quiberoni, A.; Suárez, V.B. y Reinheimer J.A. (1999a). Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J. Food Prot.* 62(8): 894 - 898.

Quiberoni, A.; Guglielmotti, D.; Binetti, A. y Reinheimer, J. (2004). Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption. *J. Appl. Microbiol.* 96: 340 - 351.

Ranhand, J.M. (1974). Simple, inexpensive procedure for the disruption of bacteria. *Appl. Microbiol.* 28: 66 - 69.

Rastall, R. A.; Gibson, G. R.; Gill, H. S.; Guarner, F.; Klaenhammer, T. R.; Pot, B.; Reid, G.; Rowland, I. R. y Sanders, M.E. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and symbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 145 - 152.

Ray, B. (2001). *Fundamental Food Microbiology*. Cap. 16: Health Benefits of Beneficial Bacteria. (Ray, B.). CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA. 211-224.

Raya, R.R.; Kleeman, E.G.; Luchansky, J.B. y Klaenhammer, T.R. (1989). Characterization of the temperate bacteriophage ϕ adh and plasmid transduction in *Lactobacillus acidophilus* ADH. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(9): 2206 - 2213.

Reid, G. (1999). Minireview. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9): 3763 - 3766.

Reinheimer, J.A. (1994). *Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos*. Las bacterias lácticas. CERIDE. Santa Fe, Argentina. 64 - 113.

Reinheimer, J.A. (2005). Estrategias para mejorar la fagorresistencia de bacterias lácticas (BAL). *Agrociencia IX* (1 y 2), 379 - 383.

Reinheimer, J.A.; Morelli, L.; Callegari, M.L. y Bottazzi, V. (1993). Phage resistance in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 328. *Microbiol. aliment. nutr.* 11: 235 - 240.

Renoux, G. y Suire, A. (1963). Spontaneous lysis and phage carrier-state in *Brucella* cultures. *J. Bacteriol.* 86: 642 - 647.

Reuter, G.; Klein, G. y Goldberg, M. (2002). Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Res. Int.* 35: 117 - 124.

Roberts, C.M.; Fett, W.F.; Osman, S.F.; Wijey, C.; O'Connor, J.V. y Hoover, D.G. (1995). Exopolysaccharide production of *Bifidobacterium longum* BB-79. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 463 - 468.

Saarela, M.; Mogensen, G.; Fondén, R.; Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84:197 - 251.

Sakurai, T.; Takahashi, T. y Arai, H. (1970). The temperate phages of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus casei*. *Japan J. Microbiol.* 14(4): 333 - 336.

Salminen, S. y Ouwehand, A.C. (2002). Encyclopedia of Dairy Sciences. Probiotics, applications in dairy products. (Roginski, H.; Fuquay, J.W. y Fox, P.F.). Academic Press Elsevier Science, Cornwall, UK. 2315 - 2322.

Salminen, S.; Deighton, M. A.; Benno, Y. y Gorbach, S. L. (1998). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Cap. 7: Lactic acid bacteria in health and disease. (Salminen, S. y von Wright, A.). Marcel Dekker Inc., New York, USA, 211 - 253.

Salvini, F. (2003). Immune system. It is possible to modulate it with probiotics? Lettera dell'Istituto Danone. *Items News.* 1 - 5.

Sanders, M.E. y Huis in't Veld, J.H. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antoine van Leeuwenhoek* 76: 293 - 315.

Sandine W.E. (1996). Dairy Starter Cultures. Cap. 7: Commercial production of dairy starter cultures. (Cogan, T.M. y Accolas, J.P.). VCH Publishers, Inc. New York, USA. 191 - 206.

Saxelin, M.; Korpela, R. y Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). Dairy Processing. Improving Quality. Cap. 1: Functional Dairy Products. (Smit, G.). Woodhead Publishing Limited y CRC Press LLC, Cambridge, England. 229 - 245.

Saxelin, M.; Tynkkynen, S.; Mattila-Sandholm, T. y de Vos, W.M. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 204 - 211.

Schaller, A.; Cabriola, S. y Guardini, E. (2003). Yogur y leche cultivada. Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/lacteos/01_Productos/yogur/Yogur_02.htm

Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2): 361S – 364S.

Schröder, W. (1984). Peracetic acid. Disinfectant for the food stuff industry. *Brauwelt International* 1, 115 – 120.

Séchaud, L.; Callegari, M.L.; Rousseau, M.; Muller, M.C. y Accolas, J.P. (1989). Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent bacteriophage 832-B1 of *Lactobacillus helveticus*. *Neth. Milk Dairy J.* 43: 261 – 277.

Séchaud, L.; Cluzel, P.J.; Rousseau, M.; Baumgartner, A. y Accolas, J.P. (1988). Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie* 70: 401 – 410.

Séchaud, L.; Rousseau, M.; Fayard, B.; Callegari, M.L.; Quénée, P. y Accolas, J.P. (1992). Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: morphology and host range. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(3): 1011 – 1018.

Servin, A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405 – 440.

Shafia, F. y Thompson, T.L. (1964). Calcium ion requirement for proliferation of bacteriophage $\phi\mu$ -4. *J. Bacteriol.* 88(2): 293 – 296.

Shimizu-Kadota, M. y Sakurai, T. (1982). Prophage curing in *Lactobacillus casei* by isolation of a thermoinducible mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(6): 1284 – 1287.

Shimizu-Kadota, M. y Tsuchida, N. (1984). Physical mapping of the virion and the prophage DNAs of a temperate *Lactobacillus* phage ϕ FSW. *J. Gen. Microbiol.* 130: 423 – 430.

Shimizu-Kadota, M.; Flickinger, J.L. y Chassy, B.M. (1988). Evidence that *Lactobacillus casei* insertion element ISL1 has a narrow host range. J. Bacteriol 170(10): 4976 - 4978.

Shimizu-Kadota, M.; Kiwaki, M.; Hirokawa, H. y Tsuchida, N. (1985). ISL1: A new transposable element in *Lactobacillus casei*. Mol. Gen. Genet. 200:193 - 198.

Shimizu-Kadota, M.; Kiwaki, M.; Sawaki, S.; Shirasawa, Y.; Shibahara-Sone, H. y Sako, T. (2000). Insertion of bacteriophage ϕ FSW into the chromosome of *Lactobacillus casei* Shirota (S-1): characterization of the attachment sites and the integrase gene. Gene 249:127 - 134.

Shimizu-Kadota, M.; Sakurai, T. y Tsuchida, N. (1983). Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. Appl. Environ. Microbiol. 45(2):669 - 674.

Simmering, R. y Blaut, M. (2001). Pro- and prebiotics – the tasty guardian angels? Appl. Microbiol. Biot. 55:19 - 28.

Spanhaak, S.; Havenaar, R. y Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. Eur. J. Clin. Nutr. 52(12):899 - 907.

Stanier, R.Y.; Wheelis, M.L.; Ingraham, J.L. y Painter P.R. (1988). Il mondo dei microorganismi. Cap. 9: I virus. (Fossati Galli, E.). Zanichelli. Bologna, Italia. 202-222.

Suárez, V.; Quiberoni, A.; Binetti, A.G.; Guglielmotti, D.; Capra, M.L. y Reinheimer, J.A. (2003). Tratamientos térmicos y químicos para prevenir infecciones por fagos de bacterias lácteas. Rev. Arg. de Lactología 22:55 - 76.

Suárez, V.B. y Reinheimer, J.A. (2002). Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. J. Food Prot. 65,1756 - 1759.

Suárez, V.B.; Quiberoni, A.; Binetti, A.G. y Reinheimer, J.A. (2002). Infecciones fágicas en la industria láctea Argentina. Incidencias e implicancias. Revista Argentina de Lactología 21:57 - 73.

Svensson V. y Christiansson A. (1991). Methods for phage monitoring. FIL-IDF Bulletin 263: 29 - 39.

Sykora, J.; Valeckova, K.; Amlerova, J.; Siala, K.; Dedek, P.; Watkins, S.; Varvarovska, J.; Stozicky, F.; Pazdiora, P. y Schwarz, J. (2005). Effects of an especially design fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 and the eradication of *Helicobacter pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. J. Clin. Gastroenterol. 39(8): 692 - 698.

Tamime, A.Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. Eur. J. Clin. Nutr. 00: 1 - 14.

Tannock, G. W. (2002). Probiotics and prebiotics: where are we going? Cap. 1: Probiotics and prebiotics: where are we going? (Tannock G. W.) Caister Academic Press. Norfolk, England. 1 - 39.

Tomioka, H. y Saito, H. (1992). The Lactic Acid Bacteria. Volume 1. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Cap. 11: Lactic acid bacteria in the support of immunocompromised hosts. (Wood, B.J.B.). Elsevier Applied Science, Cambridge, Inglaterra. 263 - 296.

Torino, M.I.; Mozzi, F.; Sesma, F. y Font de Valdez, G. (2000). Effect of stirring on growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. Milchwissenschaft 55(4): 204 - 206.

Tremblay, D.M. y Moineau, S. (1999). Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. Virol. 255(1): 63 - 76.

Tuohimaa, A.; Riipinen, K.-A.; Brandt, K. y Alatossava, T. (2006). The genome of the virulent phage Lc-Nu of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*, and comparative genomics with *Lactobacillus casei* phages. Arch. Virol. 151(5): 947 - 965.

Turchet, P.; Laurenzano, M.; Auboiron, S. y Antoine, J.M. (2003). Effect of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus casei* DN 114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J. Nutr. Health Aging* 7(2): 75 - 77.

Valyasevi, R.; Sandine, W.E. y S  ller, B.L. (1990). The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6): 1882 - 1889.

Valyasevi, R.; Sandine, W.E.; y Geller, B.L. (1991). A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J. Bacteriol.* 173: 6095 - 6100.

Vinderola, C.G. (2002). Cultivos probióticos intestinales adicionados a productos lácteos. Métodos para su cuantificación selectiva y estudio de los parámetros que condicionan su supervivencia. Tesis presentada para acceder al título de Doctor en Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.

Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (2003). Lactic acid starters and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res. Int.* 36: 895 - 904.

Vinderola, C.G., Mocchiutti, P. y Reinheimer, J.A. (2002b). Interactions among lactic acid starters and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* 85(4): 721 - 729.

Vinderola, C.G.; Costa G.A.; Regenhardt, S. y Reinheimer, J.A. (2002a). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starters and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 12: 579 - 589.

Vinderola, C.G.; Perdigón, G.; Reinheimer, J.A.; Medici, M.; Prosello, W. y Ghiberto, D. (2003). BIOQUESO Ilolay Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. *Industrias L  cteas Espa  olas* 298: 34 - 48.

Vlegels, P.A.P.; Hazeleger, W.C.; Helmerhorst, T.H. y Wouters, J.T.M. (1988). Phage resistance of *Streptococcus cremoris* due to low adsorption efficiency. *Neth. Milk Dairy J.* 42: 195 - 206.

Watanabe K.; Takesue S.; Ishibashi K.; Iwamoto T. y Kondo J-I. (1982a) Fine structure of PL-1 phage active against *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 28: 1 - 6.

Watanabe, K. y Takesue, S. (1972). The requirement of calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *J. gen. Virol.* 17: 19 - 30.

Watanabe, K. y Takesue, S. (1973). Energy requirement for the formation of blender-resistant complexes in *Lactobacillus* phage infection. *J. gen. Virol.* 20: 319 - 326.

Watanabe, K. y Takesue, S. (1975). Use of L-rhamnose to study irreversible adsorption of bacteriophage PL-1 to a strain of *Lactobacillus casei*. *J. gen. Virol.* 28: 29 - 35.

Watanabe, K.; Fukuzaki, T.; Hayashida, M. y Nakashima, Y. (1987). Electron microscopic study of the process of DNA ejection from the head of PL-1, a *Lactobacillus casei* phage. *J. gen. Virol.* 68: 569 - 572.

Watanabe, K.; Ishibashi, K.; Nakashima, Y. y Sakurai, T. (1984). A phage resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *J. gen. Virol.* 65: 981 - 986.

Watanabe, K.; Kakita, Y.; Nakashima, Y. y Miake, F. (1995). Involvement of host cell energy in the transfection of *Lactobacillus casei* protoplasts with phage PL-1 DNA. *Curr. Microbiol.* 30: 39 - 43.

Watanabe, K.; Shirabe, M.; Fukuzaki, T.; Kakita, Y.; Nakashima, Y. y Miake, F. (1993). Electron microscope studies on the host cell energy requirement for injection of PL-1 phage DNA into *Lactobacillus casei*. *Curr. Microbiol.* 26: 293 - 298.

Watanabe, K.; Shirabe, M.; Nakashima, Y. y Kakita, Y. (1991). The possible involvement of protein synthesis in the injection of PL-1 phage genome into its host, *Lactobacillus casei*. J. gen. Microbiol. 137: 2601 - 2603.

Watanabe, K.; Takesue, S. e Ishibashi, K. (1977). Reversibility of the adsorption of bacteriophage PL-1 to the cell walls isolated from *Lactobacillus casei*. J. gen. Virol. 34: 189 - 194.

Watanabe, K.; Takesue, S. e Ishibashi, K. (1979). Adenosine triphosphate content in *Lactobacillus casei* and the blender-resistant phage-cell complex-forming ability of cells on infection with PL-1 phage. J. gen. Virol. 42: 27 - 36.

Watanabe, K.; Takesue, S.; Ishibashi, K. y Nakahara, S. (1980). Simulation of the process of PL-1 phage adsorption to its host bacterium, *Lactobacillus casei* ATCC 27092. Agric. Biol. Chem. 44(4): 869 - 875.

Watanabe, K.; Takesue, S.; Ishibashi, K. y Nakahara, S. (1982b). A computer simulation of the adsorption of *Lactobacillus* phage PL-1 to host cells: some factors affecting the process. Agric. Biol. Chem. 44(4): 869 - 875.

Watanabe, K.; Takesue, S.; Jin-Nai, K. y Yoshikawa, T. (1970). Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. Appl. Microbiol. 20: 409 - 415.

Whitehead, W.E.; Ayres, J.W. y Sandine, W.E. (1993). Symposium: Recent developments in dairy starter cultures: Microbiology and Physiology. J. Dairy Sci. 76: 2344 - 2353.

Wicken, A.J.; Ayres, A.; Campbell, L.K. y Knox, K.W. (1983). Effect of growth conditions on production of rhamnose-containing cell wall and capsular polysaccharides by strains of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. J. Bacteriol. 153(1): 84 - 92.

Wilkowske, H.H.; Nelson, F.E. y Parmelee, C.E. (1954). Heat inactivation of bacteriophage strains active against lactic streptococci. Appl. Microbiol. 2: 250 - 253.

Williams, J.G.K.; Kubelkar, A.R.; Livak, K.J.; Rafalsky, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 - 6535.

Yokokura, T. (1971). Phage receptor material in *Lactobacillus casei* cell wall. I. Effect of L-rhamnose on phage adsorption to the cell wall. *Jpn. J. Microbiol.* 15(5): 457 - 463.

Yokokura, T. (1977). Phage receptor material in *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* 100(1): 139 - 145.

Yoon, S.S.; Kim, J.W.; Breidt, F. y Fleming, H.P. (2001). Characterization of a lytic *Lactobacillus plantarum* bacteriophage and molecular cloning of a lysin gene in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 63 - 74.