

Universidad Nacional del Litoral  
Facultad de Ingeniería Química



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de **Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**.

**“Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles”**

**Tesista:** Bioquímica Daniela M. Guglielmotti

**Director:** Dra. Andrea Quiberoni

**Co-Director:** Dr. Jorge A. Reinheimer

**Programa de Lactología Industrial  
Facultad de Ingeniería Química**

Santa Fe, Mayo de 2003.

---



A mi familia



---

---

Agradezco de corazón:

- Al Dr. Jorge Reinheimer, que me brindó la maravillosa oportunidad de realizar esta tesis junto a su grupo de trabajo, además de compartir sus conocimientos y tenerme infinita paciencia.
  - A la Dra. Andrea Quiberoni, mi Directora de Tesis y una hermosa persona, que me guió paso a paso a lo largo de este trabajo, allanándolo y haciéndolo todo más sencillo, con una gran predisposición y enorme vocación docente y de investigación. Gracias por transmitirme esas ganas de aprender y superarme todos los días.
  - A mis compañeras y amigas del Magister, Graciela y Vanesa, sé que siempre voy a contar con ustedes a pesar de la distancia. A Pachi y Paula, por compartir tantos momentos lindos más allá de varias horas de mates y estudio.
  - A mis compañeros del PROLAIN, Luján, Viviana, Mario, Mariana, Emilio, Alvaro, Guille, Silvina, Ana, Nancy, Gabriel y Fernanda, por hacerme sentir siempre muy cómoda y más ameno el lavado de pipetas y algunas otras cositas que no nos moríamos por hacer. Gracias a Luciana y Nando, mis amigos “del otro lado”, por los ricos mates que de vez en cuando compartimos.
  - Al resto de la gente que forma parte del PROLAIN, por la buena predisposición de todos los días, que hizo que disfrutara siempre del trabajo.
- 
-

**INDICE**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>LAS BACTERIAS LÁCTICAS .....</b>	<b>6</b>
Las bacterias lácticas en la industria láctea fermentativa .....	8
Géneros de bacterias lácticas.....	16
<i>Bacterias lácticas termófilas en la industria láctea fermentativa</i> .....	20
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> : rol en la industria láctea fermentativa .....	21
Composición química de paredes de bacterias Gram positivas .....	23
<b>LOS BACTERIOFAGOS.....</b>	<b>29</b>
Morfología y Taxonomía de los Bacteriofagos.....	30
Bacteriofagos de bacterias lácticas .....	33
Ciclo vital de un fago .....	37
Ciclo lítico.....	39
Ciclo lisogénico .....	43
Problemática en la industria láctea fermentativa.....	44
Bacteriofagos de bacterias lácticas termófilas.....	46
Fagos de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .....	47
Mecanismos de fago resistencia.....	48
Interferencias en la Adsorción .....	49
Bloqueo de la inyección del ADN fágico.....	50
Restricción- Modificación .....	51
Infección Abortiva .....	55
Inmunidad lisogénica .....	56

---

Mecanismos de resistencia diseñados por ingeniería genética .....	58
Estrategias para el control de la infección por bacteriofagos .....	61
Medios inhibidores de fagos.....	62
Tratamientos térmicos .....	63
Limpieza y desinfección del ambiente industrial: Tratamientos químicos .....	64
Cultivos de inoculación directa .....	64
Cultivos monocepa, multicepa y rotación de cultivos .....	65
Obtención de cepas con resistencia fágica mejorada .....	67
Obtención de mutantes espontáneos .....	69
Cepas insensibles a bacteriofagos (cepas salvajes) .....	70
 LA ADSORCIÓN: Etapa primaria dentro del ciclo de vida fágico.....	 70
1- Factores que la influncian .....	70
2- Receptores fágicos.....	73
3- Estrategias de identificación y caracterización de receptores fágicos en bacterias lácticas .....	73
 <b>OBJETIVOS</b> .....	 <b>76</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	 <b>78</b>
1- Aislamiento de fagos .....	79
1.1- Muestras .....	79
1.2- Tratamiento de las muestras sospechosas de contener fagos.....	79
1.3- Aislamiento de diferentes clones de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> que conforman el fermento .....	81
1.4- Ensayo de turbidez sobre los clones aislados .....	81
1.5- Spot Test sobre los clones aislados .....	82
1.6- Aislamiento de los fagos .....	83

---



---

2- Cepas .....	84
2.1- Conservación de las cepas .....	85
2.1.1- Congelamiento en caldo de cultivo adicionado de glicerol .....	85
2.1.2- Congelamiento en leche .....	85
2.1.3- Reactivación de las cepas .....	85
3- Fagos .....	85
3.1- Conservación de los fagos .....	86
4- Metodología general empleada en el estudio de bacteriofagos	
4.1- Propagación de los fagos .....	87
4.2- Titulación de los fagos .....	87
5- Caracterización de los bacteriofagos	
5.1- Microscopía electrónica .....	88
5.2- Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación .....	88
5.2.1- Viabilidad a 4 °C .....	88
5.2.2- Viabilidad a -20 °C y -80 °C .....	88
5.3- Viabilidad a distintos pH .....	88
5.4- Ciclos de multiplicación fágica (Burst Size) .....	89
6- Resistencia térmica y química de los fagos	
6.1- Cinéticas de muerte térmica .....	89
6.2- Cinéticas de muerte química .....	92
7- Caracterización molecular de los fagos	
7.1- Extracción del ADN fágico .....	92
7.2- Perfiles de restricción .....	93
7.3- Sitios de empaquetamiento (cos-, pac- sites) .....	93

---

---

8- Interacción de <i>Lb. delbrueckii</i> con sus fagos específicos	
8.1- Efecto del ion calcio sobre la lisis en medio líquido .....	94
8.2- Influencia del ion calcio en la formación de placas de lisis en medio agarizado .....	94
8.3- Adsorción .....	94
8.4- Caracterización de la adsorción	
8.4.1- Influencia del calcio .....	95
8.4.2- Influencia de la temperatura.....	95
8.4.3- Influencia del estado fisiológico celular .....	96
8.5- Ensayos de adsorción sobre paredes celulares	
8.5.1- Preparación de las paredes celulares .....	97
8.5.2- Tratamientos selectivos sobre paredes celulares .....	99
8.5.3- Ensayos de adsorción sobre las paredes tratadas.....	100
8.5.4- Reversibilidad en la unión de los fagos adsorbidos a paredes celulares purificadas	101
9- Ensayos de neutralización de fagos con monosacáridos .....	101
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>102</b>
1- Aislamiento de los fagos	
1.1- Pruebas preliminares .....	103
1.2- Aislamiento de las diferentes cepas del fermento .....	103
1.3- Caracterización del agente responsable del retardo en la acidificación .....	103
1.4- Aislamiento de los fagos .....	104
2- Caracterización de los fagos	
2.1- Microscopía electrónica.....	105
2.2- Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación.....	107
2.2.1- Viabilidad a temperatura de refrigeración (4 °C) .....	107
2.2.2- Viabilidad a -20 °C y -80 °C.....	107

---



---

2.3- Viabilidad fágica a distintos pH.....	107
2.4- Ciclos de multiplicación fágica (Burst Size) .....	108
2.5- Resistencia térmica y química de los fagos .....	110
2.5.1- Cinéticas de muerte térmica .....	110
2.5.2- Cinéticas de muerte química .....	117
3- Caracterización molecular de los fagos	
3.1- Perfiles de restricción .....	126
3.2- Sitios de empaquetamiento .....	128
4- Interacción de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> con sus fagos específicos	
4.1- Efecto del ion calcio sobre la lisis en medio líquido .....	131
4.2- Influencia del ion calcio en la formación de placas de lisis en medio agarizado .....	131
5- Adsorción	
5.1- Influencia del ion calcio sobre la adsorción .....	135
5.2- Influencia de la temperatura de incubación .....	138
5.3- Influencia del estado fisiológico celular .....	138
6- Identificación de receptores fágicos	
6.1- Ensayos de adsorción sobre paredes tratadas química y enzimáticamente.....	142
6.2- Ensayos de neutralización de fagos con monosacáridos.....	144
6.3- Reversibilidad en la unión de los fagos adsorbidos a paredes celulares purificadas .....	146
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>166</b>

---



**BIBLIOGRAFÍA** ..... 169

**ANEXO: Medios de cultivo y reactivos. Formulaciones** ..... 184

1- Medios de cultivo ..... 185

2- Reactivos de uso general ..... 186

3- Reactivos utilizados en la obtención y tratamiento de paredes celulares..... 186

    3.1- Enzimas..... 186

    3.2- Soluciones ..... 187

    3.3- Soluciones buffer ..... 187

    3.4- Reciclado de perlas de vidrio ..... 188

---

---

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se difundieron parcialmente a través de la siguiente publicación:

- Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. Quiberoni, A., Guglielmotti, D.M., Reinheimer, J.A. *International Journal of Food Microbiology* (en prensa) (2003).

---

---

# RESUMEN

---

Generalmente, los cultivos termófilos compuestos por *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, son usados fundamentalmente en la elaboración de yogur, y raramente fueron asociados a infecciones fágicas. La explicación que se daba a esta observación era que en el proceso de elaboración de yogur no se genera suero, que es el principal vehículo de los fagos, además de ser la leche es sometida a temperaturas de 80-90 °C, lo que podría reducir la carga viral. En cambio, la industria quesera utiliza temperaturas más bajas que no afectan la viabilidad de los bacteriofagos.

En las últimas décadas se ha visto un notable incremento en la producción y variedad de leches fermentadas y quesos que utilizan starters de bacterias lácticas termófilas, dando como resultado un aumento en problemas de acidificación causados por fagos que atacan a estas bacterias. Esta problemática ha llevado a los investigadores a estudiar con mayor detenimiento a estos fagos, aunque todavía hoy la información disponible es ciertamente bastante escasa. Así, los fagos más estudiados dentro de este grupo son aquellos que atacan cepas de *S. thermophilus*. Más escasa aún es la información acerca de los fagos de lactobacilos, y en particular de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Por esta razón, este trabajo tuvo como finalidad profundizar el estudio de la interacción entre cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y fagos autóctonos aislados a partir de accidentes en elaboraciones de yogur de nuestra región.

El presente estudio comenzó con el aislamiento y caracterización de los tres fagos autóctonos específicos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (fago BYM), Ab<sub>1</sub> (fago YAB) e Ib<sub>3</sub> (fago Ib<sub>3</sub>). La caracterización consistió en determinar: morfología (microscopía electrónica), viabilidad durante la conservación, viabilidad a distintos pH, ciclos de multiplicación fágica (burst size), resistencia térmica y química, y caracterización molecular. A partir de la morfología de los fagos estudiados, se determinó que los tres pertenecen al

grupo B según la clasificación de Bradley, y al morfotipo B1 de la familia *Siphoviridae*, según el criterio de Ackermann. Con respecto a su viabilidad durante la conservación, se vio que ésta fue moderada a 4 °C y -20 °C, y mayor a -80 °C. Por otra parte, se observó una buena viabilidad sólo a pH 5, 6 y 7, siendo baja a pH extremos, lo que explicaría la razón de los bajos títulos encontrados en las muestras de yogur de las cuales fueron aislados. Cuando se estudió la resistencia térmica, se pudo comprobar un efecto protector de la leche cuando ésta fue usada como medio de suspensión. Resulta interesante considerar la gran resistencia de estos fagos a los tratamientos térmicos utilizados tradicionalmente para el procesamiento de la leche cruda (pasteurización), lo cual podría señalar una muy probable vía primaria de entrada de los fagos a las plantas de elaboración. Los ensayos de resistencia frente a distintos biocidas mostraron que el ácido peracético resultó efectivo para la eliminación de las partículas fágicas. En general, el hipoclorito de sodio también resultó efectivo, aunque se observó una singular resistencia del fago Ib<sub>3</sub>, el cual sólo fue destruido con elevadas concentraciones (> 1400 ppm) de este agente. Los alcoholes etílico e isopropílico, usados normalmente en laboratorios, tuvieron escasa acción sobre estos fagos autóctonos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Del análisis de los perfiles de restricción con diferentes endonucleasas, se pudo confirmar que se trata de tres fagos distintos. Sin embargo, se pudo observar que los fagos BYM y YAB poseen algunas bandas en común, y lo mismo ocurre entre los fagos YAB e Ib<sub>3</sub>. También se calculó el tamaño del genoma de estos tres fagos, los cuales oscilaron entre 31 y 34 kb. Se observaron extremos cohesivos (cos sites) en el caso del fago Ib<sub>3</sub>, pero no para los fagos BYM y YAB.

La segunda parte de este trabajo se centró en la interacción entre las cepas bacterianas y sus fagos líticos, lo que incluyó el estudio de la calcio-dependencia, caracterización del proceso de adsorción y el estudio de receptores e inhibidores químicos y enzimáticos de la misma. Al estudiar los requerimientos para completar el ciclo lítico en medio líquido, se reveló una dependencia del ion Ca<sup>2+</sup> para los fagos YAB e Ib<sub>3</sub>. El fago

BYM mostró un comportamiento distinto, ya que fue capaz de completar el ciclo lítico tanto en presencia como en ausencia de este catión, aunque en estas últimas condiciones la lisis se observó más tardíamente. La formación de placas de lisis en medio agarizado se vio afectada por la ausencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en los fagos autóctonos analizados (fagos YAB, BYM e  $\text{Ib}_3$ ). A pesar de los resultados obtenidos, las cinéticas de adsorción revelaron que los fagos estudiados no dependen de la presencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  para llevar a cabo la primera etapa del ciclo lítico, ya que todos ellos mostraron una rápida adsorción a sus cepas sensibles. Esto nos está indicando que el requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en alguna de las etapas posteriores del ciclo lítico. Respecto a la influencia de la temperatura sobre la adsorción fágica, nuestros datos mostraron que los fagos se adsorbieron sobre las células de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* incluso a 0 °C. Las tasas máximas se alcanzaron a 10 °C para los fagos YAB e  $\text{Ib}_3$ , manteniéndose constantes y cercanas al 100% en todo el rango de temperatura estudiado. En el caso del fago BYM se observó influencia de la temperatura entre 0 °C y 20 °C, mientras que entre 20 °C y 50 °C esta influencia no se evidenció. Estos fagos se adsorbieron normalmente tanto a células viables como no viables (sometidas tratamiento térmico), lo que demuestra que los receptores fágicos son termoestables, y que el proceso de adsorción no depende del estado fisiológico celular.

También se estudió la naturaleza de los receptores celulares. La disminución de la adsorción observada luego de realizar el tratamiento con mutanolisina sobre las paredes, indicaba que la unión de los fagos a la superficie celular involucraba alguna estructura de naturaleza hidrocarbonada y no proteica. Esta idea fue confirmada luego de realizar ensayos de adsorción sobre paredes tratadas con TCA, donde se observó una reducción de la adsorción fágica. La disminución en los porcentajes de adsorción de los fagos a las paredes celulares tratadas con TCA sugiere que los receptores podrían estar constituidos por complejos peptidoglicano - polisacáridos accesorios. Por último, se demostró la irreversibilidad de la adsorción de las partículas virales a sus cepas sensibles.

# INTRODUCCIÓN

---

## LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas (BAL) abarcan una serie de géneros que se distinguen por presentar ciertas particularidades en común a nivel morfológico, metabólico y fisiológico. No existe una definición inequívoca del término **bacteria ácido láctica**, ya que inevitablemente la mayoría de las características usadas en tal definición están sujetas a variaciones y sólo pueden aplicarse bajo condiciones normales o estándares. Por lo tanto es más apropiado definir a las bacterias lácticas “típicas” como aquellas que reúnen estas características (Frank y Hassan, 1998):

- . Gram positivas,
- . catalasa negativas,
- . no esporuladas,
- . no móviles,
- . ácido tolerantes,
- . generalmente anaerobias o aerotolerantes (microaerofílicas),
- . muy exigentes a nivel nutricional,
- . generadoras de ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de hidratos de carbono,
- . carentes de citocromos,
- . no reductoras de los nitratos.

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en ambientes donde dispongan de carbohidratos altamente solubles, productos de degradación de proteínas (péptidos cortos y aminoácidos), vitaminas y una baja tensión de oxígeno. De esta manera, se hallan asociadas a hábitats ricos en nutrientes, tales como ciertos productos alimenticios (leche, carne, vegetales) y como integrantes de la flora normal del tracto intestinal,



membranas y mucosas de mamíferos (Frank y Hassan, 1998). En estos últimos hábitats juegan un importante rol benéfico, ya que protegen al organismo que los alberga de la colonización y/o infección por microorganismos patógenos.

Su adaptación a diferentes condiciones ambientales se ve favorecida por la producción de acidez, que restringe el desarrollo de otros microorganismos.

El grupo de las BAL comprende 11 géneros: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. Sin embargo, las especies de mayor importancia desde el punto de vista industrial corresponden a los siguientes:

- ✓ *Lactococcus*
- ✓ *Leuconostoc*
- ✓ *Streptococcus*
- ✓ *Lactobacillus*
- ✓ *Pediococcus*

Su participación es fundamental en la mayoría de los procesos de obtención de alimentos fermentados ya que, de un modo parcial o total, intervienen en el desarrollo de textura y de características organolépticas, así como en la preservación de una gran variedad de productos alimenticios de origen vegetal (pickles, vino, cerveza, ensilados) y de origen animal (quesos, leches fermentadas, manteca, embutidos) (Aguirre y Collins, 1994).

Como un primer criterio de clasificación de este grupo, se pueden separar los géneros según la vía metabólica utilizada para degradar los carbohidratos (glucosa, lactosa, etc.):

- × **Bacterias lácticas homofermentantes:** siguen la vía enzimática de glicólisis (Embden Meyerhof Parnas, EMP), mediante la cual producen mayoritariamente ácido láctico a partir de glucosa;

× **Bacterias lácticas heterofermentantes:** utilizan el sistema enzimático denominado 3-2-Rotura-Pentosa-Fosfato, a través del cual producen una mezcla de compuestos, además de ácido láctico: dióxido de carbono y etanol o ácido acético, en cantidades variables según la especie considerada (Grobber y col., 1995).

Otro criterio de clasificación de las BAL, de especial interés industrial, es aquel que considera la temperatura óptima de desarrollo, dividiéndose en los siguientes grupos:

× **Bacterias lácticas mesófilas:** su temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 22 °C y 30 °C. Las principales especies utilizadas en la industria pertenecen a los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

× **Bacterias lácticas termófilas:** la temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 40 °C y 50 °C, y se incluyen en este grupo a los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Craig y col., 1993; Mäyrä-Mäkinen y Brigret, 1998).

### Las bacterias lácticas en la industria láctea fermentativa

Como se vio anteriormente, sólo algunos géneros y especies pueden utilizarse en la industria alimentaria fermentativa, y de éstas, sólo unas pocas reúnen los sistemas enzimáticos que permiten su uso en la industria láctea, por contar con un metabolismo que les permite desarrollarse sobre un sustrato particular: la leche. Los géneros utilizados como starters en las fermentaciones lácticas y sus principales características son:

- ✓ ***Lactococcus*:** Cocos en cadenas, homofermentantes.
- ✓ ***Streptococcus*:** Cocos en cadenas, homofermentantes.
- ✓ ***Leuconostoc*:** Cocos en cadenas, heterofermentantes.

- ✓ **Lactobacillus:** Bacilos usualmente en cadenas. Pueden ser homofermentantes obligados, heterofermentantes facultativos o heterofermentantes obligados.

Las BAL usadas en la industria láctea fermentativa deben cumplir ciertos requerimientos primarios: ser inocuas (GRAS: Generally Regarded As Safe), producir ácido a través de la fermentación de la lactosa, producir compuestos aromáticos y poseer actividad hidrolítica sobre las proteínas de la leche (Ono y col., 1992).

Por lo tanto, la acción de las BAL en el proceso de fabricación de productos lácteos (quesos, manteca, leches fermentadas) involucra una serie de transformaciones determinantes de las características organolépticas y la calidad del producto final. Entre las de mayor importancia tecnológica pueden citarse:

- × **Fermentación de azúcares:** la producción espontánea de ácido láctico por las bacterias lácticas cuando utilizan los azúcares como fuente de carbono y energía, es una capacidad sumamente explotada industrialmente. Es el proceso que se trata de favorecer en la elaboración de cualquier producto lácteo fermentado (quesos, yogur, manteca, etc.), pero debe reprimirse durante el almacenamiento de leche cruda destinada a tratamientos industriales por calor (pasteurización y esterilización), ya que un incremento de acidez disminuye su aptitud al tratamiento térmico.

En la leche fresca, recién obtenida, el ácido láctico se encuentra sólo en trazas (20-30 mg/ lt), incrementándose luego rápidamente su concentración por el desarrollo de las bacterias lácticas. Estas producen uno u otro tipo de isómero y en concentraciones variables según el género. La producción de ácido láctico D o L depende del tipo de lactato dehidrogenasa que contenga la bacteria. La importancia del tipo de isómero que se produce está relacionada con el hecho de que los alimentos que tienen ácido L(+) láctico son los más recomendados, dado que el ácido D(-) láctico es de escasa absorción a nivel intestinal (Reinheimer, 1994).

× **Hidrólisis de proteínas:** una vez consumidos los péptidos y aminoácidos libres de la leche, las BAL se procuran compuestos nitrogenados a partir del ataque enzimático de la caseína. Aunque son moderadamente proteolíticas, su actividad resulta suficiente y fundamental para posibilitar su desarrollo en un medio como la leche (rol biológico), contribuyendo a la textura y, en menor medida, al sabor del producto final (rol tecnológico).

× **Síntesis de compuestos de aroma:** la producción de sustancias aromáticas por parte de las BAL tiene lugar a través de vías metabólicas complejas, asociadas en general a los metabolismos del citrato y del piruvato. En el caso de las leches fermentadas, estos compuestos son principalmente ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), acetaldehído, diacetilo, acetoína y 2-3 butilenglicol. Durante la maduración de quesos, sin embargo, la síntesis de compuestos aromáticos resulta mucho más incierta. Las principales sustancias volátiles se generan a partir de productos de degradación de di y tripéptidos (aminoácidos).

× **Síntesis de compuestos que influyen en la textura del producto:** ciertas cepas de BAL se caracterizan por producir sustancias mucilaginosas (exopolisacáridos) que incrementan la viscosidad de ciertas leches fermentadas (Fig. 1).

La textura del yogur es el resultado de una compleja interacción entre las proteínas de la leche, la acidez y los polisacáridos exocelulares o exopolisacáridos producidos por las cepas starters (Craig y col., 1993). Muchas cepas starters usadas en la industria láctea fermentativa que contienen *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son capaces de producir compuestos que favorecen la textura deseada y, por lo tanto, son las elegidas a nivel comercial, especialmente para la elaboración de leches fermentadas, como el yogur. Las propiedades buscadas incluyen firmeza, suavidad, viscosidad y estabilidad del gel (susceptibilidad a la sinéresis). Estas cepas son extensamente usadas en Francia y Holanda, ya que en estos países está prohibida la adición de estabilizantes de origen vegetal y animal a los yogures sin fruta. Además, existe una creciente popularidad de los productos alimenticios “100% naturales”, sin aditivos

(Schellhaass y Morris, 1985; Cerning y col., 1986; Garnot, 1987). Estas cepas pueden producir dos tipos de exopolisacáridos: unos, **capsulares**, que conforman una estructura discreta que rodea a la célula y aparentemente no interactúan con la caseína de la leche, y otros de apariencia filamentosa que son liberados al medio y no pueden ser observados mediante microscopía electrónica (exopolisacáridos **viscosos**). Hassan y col. (1996) clasificó a las cepas usadas en la elaboración del yogur en tres tipos: aquellas que no producen exopolisacáridos, aquellas que producen exopolisacáridos capsulares, y aquellas que producen exopolisacáridos capsulares y viscosos. Pueden existir cepas que produzcan sólo exopolisacáridos viscosos, pero no han sido convenientemente investigados aún.

Estos exopolisacáridos están compuestos por residuos de distintos azúcares que se disponen en un patrón repetitivo. Cerning y col. (1986) reportaron que los heteropolisacáridos producidos por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* estaban compuestos principalmente de galactosa, glucosa y ramnosa en una relación de 4:1:1. Asimismo, Grobden y col. (1995), encontraron que los exopolisacáridos producidos por *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 estaban compuestos por los mismos azúcares antes mencionados, en una relación de 6,8:1:0,7. García y col. (1991) encontraron evidencias de que estos exopolisacáridos están íntimamente asociados con proteínas y sería mejor clasificarlos como una glicoproteína.

Existe un acuerdo general en que los exopolisacáridos viscosos (que son liberados al medio), pueden traer beneficios para la textura del yogur incrementando la estabilidad y la viscosidad del gel, captando el agua libre y haciendo más lenta la exudación del suero. A pesar de esto, la sobreproducción de estos compuestos conduce a la obtención de un producto de textura indeseable. Los polisacáridos capsulares no pueden ser producidos en exceso, ya que el tamaño de la cápsula es limitado. Las cápsulas bacterianas desorganizan la microestructura del gel del yogur, produciendo una textura más suave. Las cepas que producen sólo exopolisacáridos capsulares llevan a la formación de un yogur más viscoso y más estable a la sinéresis que aquellas cepas no productoras de cápsulas. Estas también

permiten una difusión más lenta del ácido láctico hacia el exterior de la célula, haciendo que la producción de ácido por parte de éstas se interrumpa precozmente, previniendo la sobreacidificación del producto (Oberg y Broadbent, 1992).



**Fig. 1 :** Micrografía de una colonia filante (productora de exopolisacáridos) de *Lb. bulgaricus*, en donde se observa su forma espiralada. Aumento 9.000 X (Bottazzi, 1984).

× **Producción de compuestos de inhibición:** ciertas BAL producen, además de los ácidos orgánicos resultantes de la fermentación de la lactosa, cantidades pequeñas de sustancias inhibitorias como peróxido de hidrógeno, antibióticos y bacteriocinas, que preservan la calidad del producto final al dificultar el desarrollo de microorganismos indeseables, tanto alterantes como patógenos (Cerning y col., 1986; Ono y col., 1992; Reinheimer, 1994; Frank y Hassan, 1998; Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 1998).

El término “bacteriocina” fue introducido por Jacob y col. (1953), y se definió como un antibiótico (producido por bacterias) de naturaleza proteica, de peso molecular relativamente elevado, que actúa sobre otras bacterias de la misma especie, o sobre aquellas que están relacionadas taxonómicamente, a través de la adsorción a receptores que se encuentran en las células blanco. Una primera clasificación se basa en el espectro de acción, dividiéndose en dos clases: **1)** aquellas bacteriocinas que actúan sobre cepas relacionadas a nivel taxonómico y **2)** aquellas activas sobre especies no relacionadas. Las bacteriocinas del primer grupo favorecerán el desarrollo de las bacterias que las producen si forman parte de un cultivo mixto, y pueden ser importantes en el control de las fermentaciones naturales o

artesanales. Las bacteriocinas del segundo grupo tienen un interés adicional ya que podrían ser importantes para evitar el desarrollo de bacterias patógenas o contaminantes.

De acuerdo a su estructura, se han definido cuatro clases de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Earnshaw, 1992; Desmazeaud, 1996; Ouwehand, 1998) (Tabla1).

**Tabla 1:** Clases de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Ouwehand, 1998).

Clase	Subclase	Descripción
<b>Clase I</b>		Lantibióticos
<b>Clase II</b>		Péptidos pequeños (< 10 kDa), con termoestabilidad moderada (100 °C) a elevada (121 °C). No contienen lantionina
	IIa	Péptidos activos contra <i>Listeria</i>
	IIb	Dipéptidos
	IIc	Péptidos con grupo tiol
<b>Clase III</b>		Proteínas de gran tamaño (> 30 kDa), termoestables
<b>Clase IV</b>		Bacteriocinas complejas: proteínas + lípidos y/o carbohidratos

- I) **Lantibióticos**, cuyo modelo típico es la *nisina*, que es un polipéptido producido por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, y posee una alta proporción de lantionina y  $\beta$ -metil lantionina. Posee un amplio espectro de actividad contra las bacterias Gram positivas, impidiendo incluso la germinación de los esporos de ciertas especies de *Bacillus* y *Clostridium*. A pesar de esto, se ha visto que muchos microorganismos Gram positivos no productores de nisina poseen una resistencia natural a este compuesto. *Bacillus cereus* es un ejemplo de esto, y es capaz de destruir la actividad de la nisina a través de la reducción de los dehidroaminoácidos que posee en su estructura. Los esporos de *Clostridium botulinum* pueden ser inhibidos por la nisina, pero las concentraciones necesarias para hacerlo son elevadas, por lo que en la práctica, se utiliza una combinación de nisina y nitritos como agentes anti-botulínicos. Las bacterias Gram negativas (como la *E. coli*) solo se ven afectadas cuando existe un daño subletal en sus membranas externas.



Bajo estas condiciones, otras bacteriocinas también presentan actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram negativas.

Se han postulado muchos mecanismos de acción de la nisina a través de los años. Se cree que actúa a nivel de la membrana celular. La nisina no necesita unirse a ningún receptor para interactuar con la membrana celular, a diferencia de algunos otros péptidos con propiedades antimicrobianas (Earnshaw, 1992; Ouwehand, 1998). Una vez realizada la unión, la nisina produce poros en la membrana celular causando una despolarización de éstas, aunque se ha observado que se necesita de un cierto potencial de membrana inicial para su actividad (Earnshaw, 1992).

- II) **Péptidos pequeños hidrofóbicos y termoestables (< 13.000 D).** Estos destruyen la integridad de la membrana a través de la formación de poros. Un ejemplo de esta clase de bacteriocinas son las *lactococcinas* que, a diferencia de la nisina, actúan sobre las células blanco sin necesidad de un potencial de membrana, pero sí de un receptor específico para su unión.
- III) **Proteínas de gran tamaño termolábiles (> 30.000 D).** Este tipo de bacteriocinas han sido aisladas de algunas cepas del género *Lactobacillus*. Los mecanismos de acción no están dilucidados aún.
- IV) **Bacteriocinas complejas: proteínas unidas a lípidos o a carbohidratos.** La existencia de este tipo de bacteriocina no está aceptado generalmente, y se pueden incluir bacteriocinas que no han podido ser purificadas de manera adecuada. Al igual que en el caso de las del tipo III, se desconoce su mecanismo de acción.

Es muy importante distinguir a las bacteriocinas de otros compuestos inhibidores producidos por las BAL ( $H_2O_2$ , ácidos láctico y acético). Esto se logra neutralizando el

sobrenadante de un cultivo y luego determinando la actividad en presencia y ausencia de proteinasa, que inactiva a las bacteriocinas si están presentes.

Todas las bacterias capaces de producir bacteriocinas deben poseer algún tipo de inmunidad codificado en sus genes, que las proteja de los efectos inhibitorios de estos compuestos.

Como ya se mencionó anteriormente, una primera consecuencia tecnológica de la producción de bacteriocinas sería una posible dominancia de la cepa productora ( $Bac^+$ ) sobre las otras que forman parte de un cultivo mixto ( $Bac^-$ ) luego de sucesivos repiques. Otra consecuencia es la posibilidad de obtener nuevos starters que inhiban bacterias indeseables como *Clostridium tyrobutyricum*, responsable de la hinchazón tardía y de la fermentación butírica en quesos, y *Listeria monocytogenes*, que es un microorganismo patógeno para el ser humano. Una desventaja sería que la calidad del producto final podría estar alterado, ya que estas bacteriocinas impedirían el desarrollo adecuado del resto de las bacterias que componen el cultivo starter, interfiriendo en la acidificación o en la producción adecuada de compuestos de flavor (Desmazeaud, 1996).

### **Géneros de Bacterias Lácticas**

En las décadas pasadas, se han producido significativos avances que permitieron el conocimiento de la taxonomía de muchas bacterias, incluyendo a las BAL. Estos avances derivan de estudios en microbiología molecular, análisis de proteínas celulares, hibridaciones ADN:ADN y ADN:ARNr, mapeos de ADN cromosomal, y determinación de secuencias de nucleótidos de los ARN ribosomales (ARNr) 16S y 32S.

Como el ARNr está involucrado en la síntesis proteica, muchas de sus secuencias se han conservado durante la evolución. La comparación de estas secuencias, en especial aquellas pertenecientes a la subunidad 16S del ARNr, han sido particularmente muy útiles en el estudio del parentesco entre las bacterias (filogenética). Existen pequeñas secuencias

en el ARNr que no han sido conservadas. Estas se denominan regiones variables, y estas son las usadas para diferenciar a las especies estrechamente relacionadas. Es posible definir secuencias específicas para géneros, especies y subespecies. En general, los resultados obtenidos mediante estas técnicas se correlacionan perfectamente con los obtenidos a partir del análisis fenotípico. A pesar de esto, existen algunos casos en los cuales los resultados no coinciden, por lo que estas técnicas deben ser complementadas con los análisis fenotípicos tradicionales.

Como resultado de estos estudios, muchas BAL fueron ubicadas en nuevos géneros y sus nombres se modificaron (Cogan, 1996).

✗ **Lactococcus:** se presentan como cocos aislados, en pares o en cadenas, donde adquieren una forma elongada en dirección de la cadena, presentando una forma bacilar que puede prestarse a confusiones (cocobacilos). Son fermentadores de azúcares en forma homofermentativa, produciendo ácido L-láctico, y crecen a 10 °C pero no a 45 °C. Existen cinco especies en este género, y para su diferenciación se utilizan el tipo de peptidoglucano y de ácido lipoteicoico de la pared celular, la capacidad para usar arginina, la temperatura máxima de crecimiento, y patrones de fermentación de azúcares.

La única especie importante usada en cultivos iniciadores (starters) es *L. lactis*, que está dividida en dos subespecies: *L. lactis* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *lactis*. La principal diferencia fenotípica entre estas dos subespecies es que *L. lactis* subsp. *lactis* crece a 40 °C, a pH 9,2, en presencia de 4% de NaCl, y produce amonio a partir de la arginina, mientras que *L. lactis* subsp. *cremoris* no lo hace.

Una propiedad fenotípica importante de algunos lactococos usados en los starters es su capacidad para metabolizar el citrato a CO<sub>2</sub> y compuestos de flavor. Esto se lleva a cabo mediante un sistema transportador de citrato que está codificado en un plásmido, y la enzima citrato liasa, que está codificada en el cromosoma bacteriano.

Aquellos capaces de metabolizar el citrato se denominan Cit<sup>+</sup>. En general, los lactococos Cit<sup>+</sup> no producen tanta acidez en leche como los lactococos Cit<sup>-</sup> (Cogan, 1996).

× **Leuconostoc:** son cocos que se agrupan en pares y cadenas, presentando forma elipsoidal en ciertas ocasiones. A veces resulta complicado diferenciar morfológicamente *Lactococcus* de *Leuconostoc*. Estos se distinguen de *Lactococcus* en tres aspectos fundamentales: **(a)** *Leuconostoc* fermenta los azúcares en forma heterofermentativa; **(b)** produce ácido D(-) láctico en vez de ácido L(-) láctico; **(c)** no muestra cambios visuales en leche tornasolada (con la excepción de *Lc. lactis*), a menos que se le adicione extracto de levadura. *Lc. lactis* produce pequeñas cantidades de ácido en leche tornasolada, pero no lo reducen antes de la coagulación.

A pesar de que *Leuconostoc* ha sido identificado como componente de cultivos iniciadores mixtos, todavía no se han identificado en el aspecto taxonómico las especies implicadas. De las 7 especies reconocidas de este género, sólo *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* está ciertamente involucrada, y la única fuente que se conoce son los cultivos iniciadores. *Lc. lactis* probablemente esté también implicada, pero resulta muy difícil aislarla fenotípicamente cuando otras especies están en el mismo ambiente, y esto es una razón más por lo cual no han sido categóricamente identificadas las especies que participan en los cultivos iniciadores. Estos se distinguen sobre todo por sus requerimientos nutricionales, homología de ADN, y patrones de fermentación de carbohidratos.

Este género se encuentra en los mismos hábitats que los lactobacilos heterofermentativos (Cogan, 1996).

× **Streptococcus:** Este género posee 27 especies, pero sólo uno de ellos, *S. thermophilus*, se encuentra en los cultivos iniciadores. Al igual que *Lactococcus* y

*Leuconostoc*, esta especie se organiza en pares o en cadenas, algunas de las cuales pueden ser muy largas. Estudios de hibridación ADN:ADN demostraron una alta homología con *S. salivarius*, que es un habitante normal de la boca, por lo cual se lo había relegado al nivel de subespecie como *S. salivarius* subsp. *thermophilus*; pero estudios más recientes han hecho que se retome la denominación original, *S. thermophilus*.

Al igual que *Lactococcus*, *S. thermophilus* fermenta azúcares por glicólisis y produce ácido L-láctico. Es limitado el espectro de azúcares que es capaz de fermentar. Se diferencia fácilmente de *Lactococcus* y *Leuconostoc*, ya que *S. thermophilus* es capaz de crecer a 45 °C, mientras que éstos no se desarrollan por arriba de 40 °C. Por su desarrollo a 45 °C puede ser confundido con *Enterococcus*, encontrado generalmente en los cultivos artesanales, pero éste es capaz de crecer a 10 °C, en 6,5% de NaCl y a pH 9,6, mientras que *S. thermophilus* es incapaz de desarrollarse en esas condiciones (Cogan, 1996).

✗ **Enterococcus:** se encuentran presentes en cultivos artesanales en un nivel elevado. Tanto *E. faecalis* como *E. faecium* han sido identificados en uno o más productos alimenticios. Tienen propiedades ideales para formar parte de los cultivos iniciadores, ya que producen ácido rápidamente, resisten las temperaturas de cocción de los quesos duros, y toleran altas concentraciones de sal (6,5% NaCl). La mayor desventaja que presentan es que son de origen fecal y que algunas cepas son patógenas. Las dos especies nombradas desarrollan tanto a 10 °C como a 45 °C, a pH 9,6, producen amoníaco (NH<sub>3</sub>) a partir de arginina y poseen el antígeno de grupo D. Estas especies se diferencian por la reducción de telurito y por el perfil de fermentación de azúcares (Cogan, 1996).

□ **Lactobacillus:** comprende a un amplio grupo de bacilos, de longitud variable, y pueden ser curvos, cortos, corineiformes o cocobacilos. Actualmente existen 64 especies en este género. En base al metabolismo de los azúcares, se dividen en tres grupos: el Grupo I se compone de especies que son homofermentantes obligados de hexosas y no fermentan pentosas. El Grupo II está formado por aquellos heterofermentantes facultativos de hexosas (por ejemplo, fermentan hexosas por glicólisis hasta ácido láctico o, bajo condiciones de glucosa limitante, producen ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico), y las pentosas son fermentadas por la vía de la fosfocetolasa a ácido láctico y ácido acético. El Grupo III reúne a las especies heterofermentantes obligadas de azúcares.

Los lactobacilos utilizados en los cultivos iniciadores comerciales son *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, y *Lb. helveticus*; todos ellos se encuentran en el Grupo I. La restante subespecie de *Lb. delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, no se encuentra en los starters, probablemente porque no fermenta la lactosa. *Lb. acidophilus* es agregado en forma intencional en ocasiones al yogur luego de la elaboración. Este también pertenece al Grupo I y es un habitante normal del tracto intestinal. No forma parte de los cultivos iniciadores en un sentido tradicional, ya que no juega un rol importante en la producción de ácido, pero es agregado por sus probables beneficios a la salud. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus*, y *Lb. acidophilus* son termófilos y crecen a temperaturas iguales o superiores a 45 °C. Producen mucha mayor cantidad de ácido en la leche que el resto de las bacterias usadas en los starters, y pueden diferenciarse entre sí por el perfil de fermentación de los azúcares y el tipo de isomería del ácido láctico producido.

*Lb. casei* y *Lb. plantarum* se encuentran comúnmente en cultivos artesanales, y *Lb. curvatus* en quesos madurados. Todos ellos forman parte del Grupo II. Estos organismos fermentan los azúcares en forma homofermentantativa y no producen NH<sub>3</sub> a partir de la arginina. Todos crecen a 15 °C y ninguno (excepto *Lb. casei* subsp.

*rhamnosus*) crecen a 45 °C. *Lb. curvatus*, como su nombre lo indica, forma distintos tipos de bacilos curvos. Estos se diferencian entre sí por el perfil de fermentación de azúcares y otros rasgos fenotípicos.

*Lb. fermentum* también se encuentra generalmente en los cultivos artesanales. Es heterofermentante obligado (Grupo III) y crece a 45 °C (Cogan, 1996).

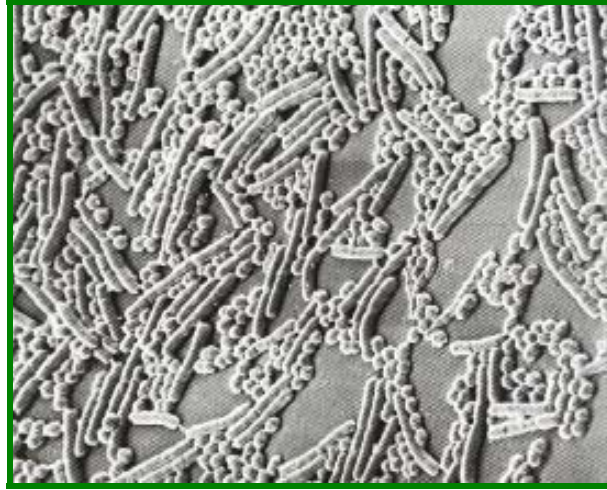
### **Bacterias lácticas termófilas en la industria láctea fermentativa**

Los fermentos lácticos integrados por especies bacterianas termófilas son destinados a procesos de obtención de productos lácteos (quesos y leches fermentadas) que involucran altas temperaturas de calentamiento.

En la industria quesera, estos fermentos son utilizados para la elaboración de quesos de pasta cocida y semi-cocida. Las variedades más importantes y conocidas son los quesos italianos de pasta muy dura como el Parmesano, Grana y Provolone, y los quesos tipo suizo como el Emmental y el Gruyère. En Argentina, los principales son Reggianito, Sardo y Sbrinz. En estos quesos se utilizan fermentos constituidos por mezclas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* y *S. thermophilus* en diferentes proporciones y, en general, integrando fermentos naturales de suero (Auclair y Accolas, 1983; Reinheimer, 1994; Varnan y Shutherland, 1994; Reinheimer y col., 1996).

La aplicación más extendida de los cultivos termófilos es, sin duda, en la elaboración de yogur, donde se utiliza una combinación de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* (Fig. 2). El desarrollo protocooperativo entre estos dos organismos deriva en una rápida acidificación. La presencia del lactobacilo estimula el desarrollo de *S. thermophilus*, ya que el lactobacilo libera aminoácidos y péptidos a partir de la caseína. A su vez, *S. thermophilus* estimula el crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produciendo ácido fórmico, piruvato y CO<sub>2</sub>, además de consumir el oxígeno y disminuir el pH

el medio (Craig y col., 1993). El yogur también puede ser adicionado de *Lb. acidophilus* u otro microorganismo con propiedades benéficas para la salud (probióticos).



**Fig. 2:** Micrografía de un cultivo compuesto por *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* utilizado en la producción de yogur. Aumento 3.750 X (Bottazzi, 1984).

### ***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: rol en la industria láctea fermentativa**

Como ya se mencionó anteriormente, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es uno de los dos microorganismos termófilos que se usa para la elaboración del yogur, junto a *S. thermophilus*. Estos dos organismos interactúan en la leche en forma favorable para ambos, pero que no es obligatoria para su desarrollo individual. Este tipo de relación se denomina “protocooperación”, y en un cultivo mixto se manifiesta con una gran producción de ácido, la cual es mayor que la suma de la producción de ácido de los cultivos puros por separado. De esta manera, en el yogur, el crecimiento de *S. thermophilus* es estimulado por los aminoácidos libres y péptidos liberados a partir de las proteínas de la leche por *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La producción de ácido de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es estimulado por el ácido fórmico y el CO<sub>2</sub> producido por *S. thermophilus* (Ono y col., 1992; Craig y col., 1993).



Si *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es tratado con lizosima o sometido a un shock de presión osmótica, existe una pérdida de proteinasas que provienen de distintas localizaciones, y la ubicación individual de cada proteinasa no está clara. De todas formas, se sabe que *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* posee proteinasas en la periferia celular, y que los péptidos que se producen por acción de estas proteinasas son un factor importante en la protooperación con *S. thermophilus* durante la elaboración de yogur, ya que los péptidos liberados por las proteinasas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son usados por *S. thermophilus*. Esta actividad proteolítica se produce especialmente sobre la  $\beta$ - caseína de la leche (Ono y col., 1992).

Remontándonos en el tiempo, vemos que el yogur ha sido consumido durante siglos, aunque no fue hasta principios del siglo XX cuando se popularizó y difundió como alimento. Fue por primera vez en 1907, en la obra de Eli Metchnikoff "*The Prolongation of Life*", que se introdujo la idea de la existencia de una serie de efectos benéficos relacionados al consumo regular de leches fermentadas (Naidu y col., 1999)

Se tienen noticias de que en el año 1542 el rey de Francia padecía serias afecciones gastrointestinales que le producían un gran malestar. Llegaron a sus oídos comentarios sobre un médico de Constantinopla que podría curarlo, por lo que envió a uno de sus hombres para que le trajera a aquel médico. Este comenzó a suministrarle una sustancia preparada con leche y fermentos (yogur), y la salud del rey mejoró notablemente hasta llegar a la curación al cabo de un tiempo. Aunque el rey lo ignorara hasta entonces, se trataba de un producto tan antiguo como la humanidad, que ya en la Biblia era mencionada por Moisés como uno de los alimentos que Jehová daba a su pueblo.

Fueron las comunidades nómades del sudeste de Asia las que aprendieron en primer lugar las técnicas para su preparación cuando, al almacenar la leche en bolsas de piel, observaron que ésta se transformaba por acción del calor y la fermentación natural, en un producto viscoso y agradable. En 1295, al regreso de sus viajes por el Oriente, Marco Polo hace referencia a este alimento en su "*Libro de las Maravillas*".

El yogur es originario de Asia, y entró a Europa a través de Turquía y Bulgaria. Su nombre deriva precisamente de la palabra *juart*, de la lengua búlgara. Sin embargo, su consumo recién comenzó a extenderse por todo el mundo a principios del siglo XX, al registrarse la primera experiencia con valor científico. El Dr. Elías Metchnikoff (Premio Nobel de Medicina en 1908), trabajando en el Instituto Pasteur de París, realizó investigaciones sobre la longevidad. Observó que en Bulgaria, en una zona de los Balcanes, sus habitantes vivían muchos más años que en otras partes del mundo y dedujo que esto se debía a las costumbres alimentarias de esa gente. Comprobó que la misma estaba basada principalmente en la ingestión de una leche que dejaban cortar en forma espontánea y que hoy llamaríamos yogur. Quizá las condiciones ecológicas del lugar, ese microclima, era lo que lograba el milagro que ellos desconocían pero con el cual se beneficiaban viviendo más años. Metchnikoff desarrolló la teoría de que el equilibrio intestinal genera una salud equilibrada. En su tratado sobre la longevidad recomienda el yogur como alimento fundamental. Con el transcurso de los años y el avance de la tecnología, se fue logrando una producción controlada y estable de este alimento, utilizándose en su elaboración el *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Bulgaria) y el *Streptococcus thermophilus* (Naidu y col., 1999).

### **Composición química de paredes de bacterias Gram positivas**

En las paredes celulares de las eubacterias existe una capa que es la responsable principal de la resistencia de la pared. La capa rígida tanto de las bacterias Gram negativas como de las Gram positivas es muy semejante en su composición química. Esta capa, denominada *peptidoglicano*, es una delgada lámina compuesta de dos derivados de carbohidrato, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, así como un pequeño grupo de aminoácidos que consta fundamentalmente de L-alanina, D-alanina, D-ácido

glutámico y lisina, o ácido diaminopimélico (DAP) (Fig. 3). Estos constituyentes están conectados entre sí para formar una estructura repetitiva, el *tetrapéptido glicano*.

La estructura básica es en realidad una delgada lámina en la cual las cadenas de glicanos formadas por los carbohidratos están conectadas por enlaces peptídicos cruzados formados por los aminoácidos. Los enlaces glicosídicos que conectan los carbohidratos son muy fuertes, pero no proporcionan rigidez en todas las direcciones. La resistencia total de la estructura de los peptidoglicanos se obtiene cuando las cadenas se unen por medio de los enlaces peptídicos cruzados, y mayor es la rigidez cuanto más completo sea este entrecruzamiento.

La forma de una célula está determinada por la longitud de las cadenas de peptidoglicano, así como por la forma y el grado del entrecruzamiento de las cadenas.

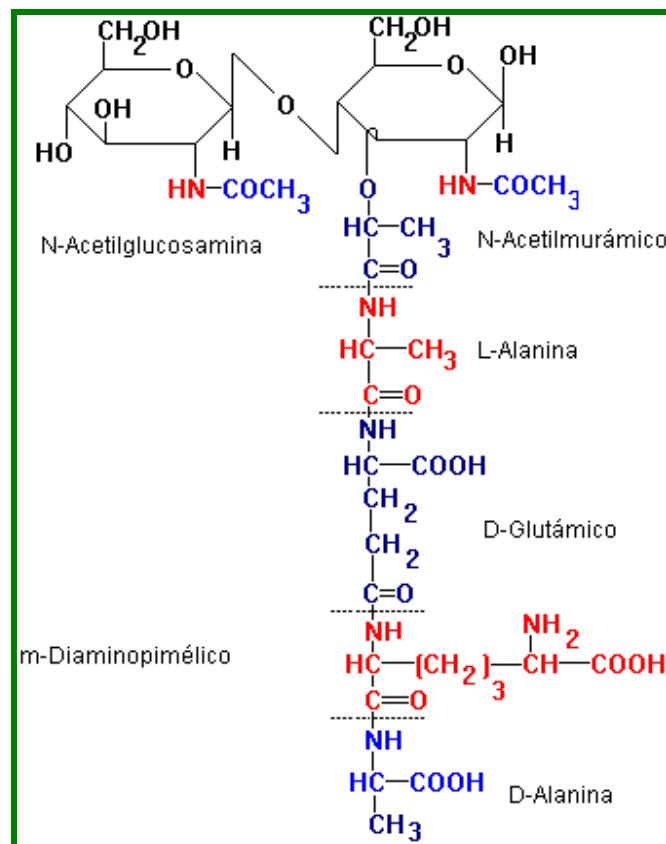


Fig. 3: Estructura química de la pared bacteriana.

Se conocen casi 100 tipos diferentes de peptidoglicanos y la máxima variación se da en los puentes de conexión. Cualquiera de los aminoácidos presentes en el tetrapéptido, también se puede presentar en la interconexión, pero además se pueden encontrar en ellas otros aminoácidos diferentes. Algunos aminoácidos nunca se encuentran en la interconexión (aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos, aquellos que contienen azufre e histidina, arginina y prolina).

En las bacterias Gram positivas casi el 90% de la pared está constituida por peptidoglicanos, aunque otro tipo de constituyentes, como el ácido teicoico (viene del griego *teicos*: "pared"), está generalmente presente en pequeñas cantidades. Los ácidos teicoicos incluyen todos los polímeros de la pared, la membrana, o capsulares que contienen residuos de glicerofosfatos o de fosfatos de ribitol. Algunos de estos ácidos que contienen glicerol están unidos al lípido de la membrana de las bacterias Gram positivas; debido a que estos ácidos teicoicos están íntimamente asociados con los lípidos reciben el nombre de ácidos lipoteicoicos.

La diferencia en la tinción de Gram entre las bacterias no está relacionada directamente con el tipo de constituyentes químicos que forman la pared, sino más bien con la estructura física de ésta, puesto que las levaduras, que tienen una gruesa pared celular de una composición química totalmente diferente también son organismos Gram positivos.

Hay que recordar que en la reacción de Gram se forma un complejo cristal violeta-yodo, insoluble dentro de la célula, y que este complejo es extraído por alcohol de las bacterias Gram negativas pero no de las positivas. Las bacterias Gram positivas tienen paredes celulares muy gruesas que se deshidratan con el alcohol. Esto produce que se cierren los poros de la pared, evitando que los complejos insolubles cristal violeta-yodo salgan de las células. En las bacterias Gram negativas el solvente se disuelve fácilmente penetrando al interior y atravesando la capa externa; la delgada capa de peptidoglicanos no evita el paso de dicho solvente (Fig. 4) (Brock, 1991).

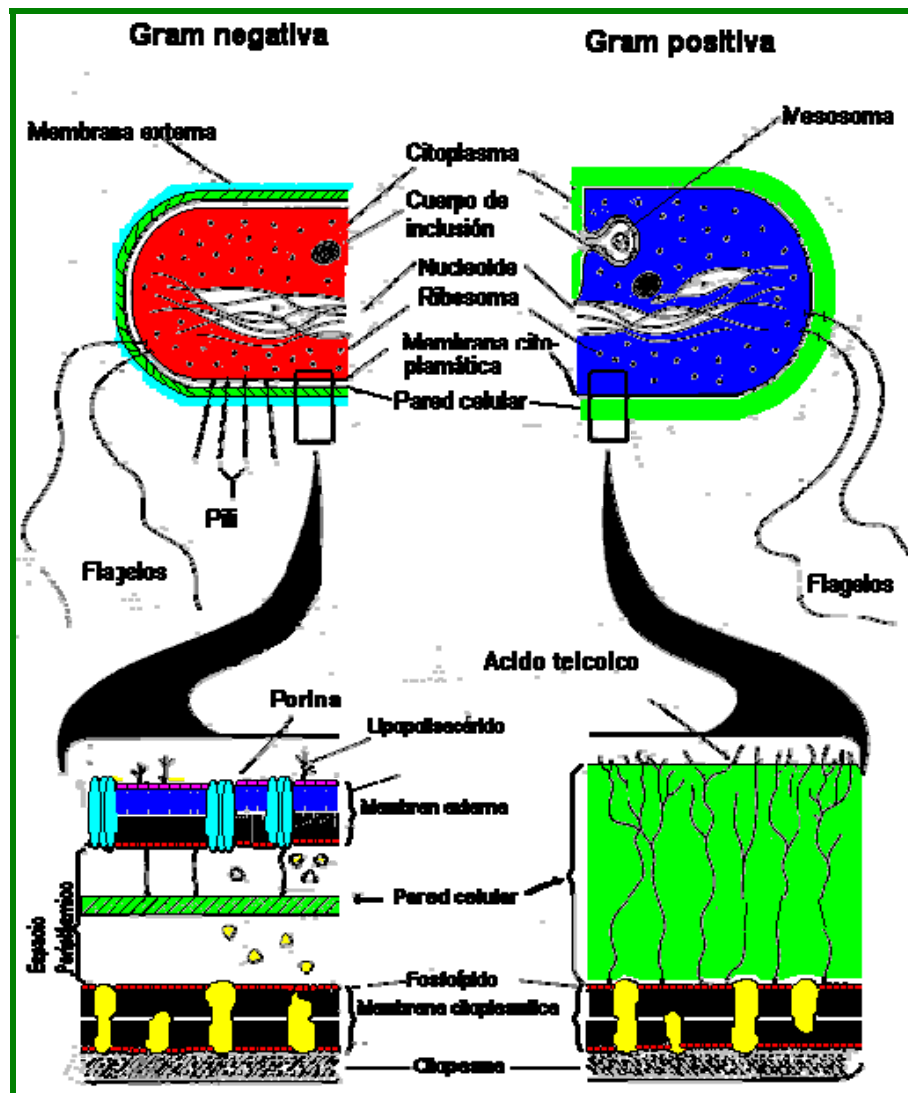


Fig. 4: Diferencias en la composición de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Muchas bacterias y algunas algas eucariotas poseen ciertas estructuras de superficie que forman parte de la pared celular denominadas *S-layers*. Estas están compuestas en general por una única clase de proteína o glicoproteína. Las subunidades proteicas que lo componen forman cubiertas porosas que recubren totalmente la célula. Al formar parte de la cubierta externa de la pared celular, e incluso reemplazar a otras estructuras de la pared, son capaces de cubrir una variedad de roles y funciones biológicas. Algunos de estos roles son comunes a las estructuras de superficie en general, mientras que otros son específicos de las *S-layers*. Ejemplo de esto son la adhesión celular, protección contra el ataque de

protozoos y fagocitos, factor de virulencia, propiedades antigénicas, sitios de anclaje para exoenzimas hidrolíticas, receptores para fagos, función de porina, etc. También pueden afectar la tinción de Gram. Finalmente, existen otros aspectos (ensamblaje de estructuras, modulación de sus propiedades, excreción y regulación de su síntesis) que son comunes con las funciones biológicas propias de la estructura celular (Aguirre y Collins, 1994; Axelsson, 1998).

Años atrás se investigó más sistemáticamente la presencia de S-layer en 13 especies diferentes de lactobacilos mediante electroforesis en SDS-PAGE y tinción negativa (método para la observación por microscopía electrónica). *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* y *Lb. buchneri* exhibieron S-layer así como también *Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus* y *Lb. acidophilus*. En el caso de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, existen controversias acerca de la verdadera presencia de esta estructura (Reinheimer, 1994).

Las funciones biológicas del S-layer presente en *Lb. helveticus* no se han dilucidado aún, al parecer la resistencia al tratamiento con lizosima podría estar relacionada a su presencia. En *Lb. helveticus* CNRZ 892 se sugirió que tendría un rol de receptor para el bacteriofago lítico CNRZ 832-B1 (Morelli y Callegari, 1997).

## LOS BACTERIOFAGOS

Los bacteriofagos o fagos son virus que atacan bacterias. Estos se encuentran en todos los ambientes naturales. Twort identificó el primer ataque de fagos en Inglaterra en 1915 y los llamó agentes “no retenidos por los filtros”, y en 1917 d’Hérelle los denominó *bacteriofagos*, que significa “comedor de bacterias” en griego antiguo. En 1928 se observó y comunicó el primer ataque fágico a una bacteria láctica (Neve, 1996).

Como todos los virus, los fagos son incapaces de desarrollarse por sí mismos; en cambio, crecen en forma parásita dentro de la célula bacteriana y se liberan luego de producir la lisis celular. Los fagos son específicos de un huésped y normalmente atacan sólo a cepas muy relacionadas entre sí (Neve, 1996).

La producción de quesos y leches fermentadas depende de la actividad de los cultivos iniciadores (starters). La capacidad de fermentar de las bacterias acidolácticas puede ser severamente inhibida por una gran variedad de factores, como bacteriocinas (nisina), residuos de antibióticos o desinfectantes, o el sistema de la lactoperoxidasa presente en la leche cruda. De todas maneras, el problema más grave a nivel comercial proviene de las infecciones por fagos, que puede conducir a una marcada reducción de la producción de ácido láctico por parte de las BAL (“tinajas lentas”) o, en casos extremos, ausencia total de acidificación (“tinajas muertas”). Como consecuencia de esto, las funciones bioquímicas y tecnológicas de los starters (que incluyen la producción de ácido láctico, formación de compuestos que afectan el flavor y la proteólisis) están severamente afectadas (Neve, 1996). Por el gran riesgo económico que esto implica, el control de las infecciones fágicas es un punto crítico de control en el manejo de las bacterias lácticas usadas como starters. Para llevarlo a cabo, es fundamental conocer y entender los complejos y dinámicos mecanismos de la relación fago-célula hospedadora, incluyendo a) la caracterización de la población fágica involucrada, b) el análisis de los sistemas naturales de defensa bacteriana ante el ataque fágico (mecanismo de fagoresistencia), y c) la identificación de los mecanismos de “antirresistencia” de los fagos (Josephsen y Neve, 1998).

## Morfología y Taxonomía de los Bacteriofagos

La estructura de la mayoría de los virus está fundamentada en los mismos principios: poseen un núcleo compuesto de ácidos nucleicos, que contienen la información genética necesaria para su replicación, rodeado de una cubierta proteica llamada “cápside”. El conjunto formado por los ácidos nucleicos (genoma) y la cápside, se conoce como “nucleocápside”. La nucleocápside está organizada según los siguientes patrones básicos:

- × **Con simetría helicoidal:** el ácido nucleico se encuentra como un filamento extendido, rodeado por moléculas de proteínas dispuestas helicoidalmente de tal forma que se disponen alrededor de un único eje de rotación;

- × **Con simetría icosaédrica:** aquí el ácido nucleico se encuentra fuertemente condensado y protegido por una cubierta proteica casi esférica, cuyas subunidades se agrupan formando capsómeros. Estos capsómeros son subunidades morfológicamente idénticas entre sí y están perfectamente ensambladas.

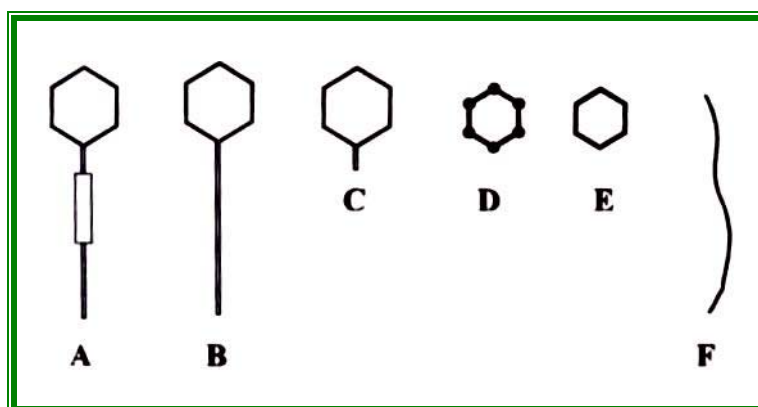
Los principios fundamentales acerca de la estructura de los virus en general fueron precedidos por Crick y Watson (Crick y Watson, 1956; Crick, 1957), basados en estudios sobre viriones (partícula infectiva completa) constituidos por ARN. Ellos señalaron que este ARN era suficiente sólo para codificar un pequeño número de proteínas de bajo peso molecular, por lo que la única manera de formar una cápside era empleando en forma repetitiva la misma clase de molécula. También argumentaron que la mejor manera de empaquetar subunidades similares era a través de un arreglo simétrico. Por lo tanto el empleo de sólo unos pocos tipos de subunidades tiene resultados interesantes, tanto al minimizar la cantidad de información genética necesaria para codificar cápsides específicas como para asegurar un ensamble eficaz (Bradley, 1967).

Los bacteriofagos más complejos presentan una estructura *binaria*; es decir, poseen una cabeza, habitualmente hexagonal, constituida por el genoma del fago contenido dentro



de una única cápside que es resistente a la acción de las proteasas, y una cola, de estructura helicoidal, que cumple la función de unirse a los receptores ubicados en la superficie de la célula huésped cuando se inicia una infección. Además, a través de la cola, el ADN es inyectado hacia el interior de la célula.

Existen varios criterios para clasificar a los bacteriofagos. La clasificación de Bradley (1967) se basa principalmente en sus características morfológicas dividiéndolos en seis grupos, y amplía esta clasificación teniendo en cuenta el tipo de ácido nucleico que poseen. El tipo más complejo, el grupo A, posee una cabeza hexagonal que puede o no ser elongada (prolata), una cola larga contráctil y puede tener estructuras adicionales (fibras, etc.). El grupo B también posee una cabeza hexagonal, cola larga no contráctil, y puede tener o no estructuras adicionales. Dentro del grupo C encontramos a aquellos con cabeza hexagonal y cola corta no contráctil. El grupo D no posee cola, y su cabeza hexagonal posee capsómeros grandes o protuberancias en sus vértices. En el grupo E el virión presenta una forma hexagonal sencilla, sin capsómeros grandes. El grupo F es un poco diferente al resto, ya que posee la forma de un filamento largo y flexible y no posee estructuras adicionales de ningún tipo. Cada uno de estos grupos posee un mismo tipo de ácido nucleico (Tabla 2 y Fig. 5).

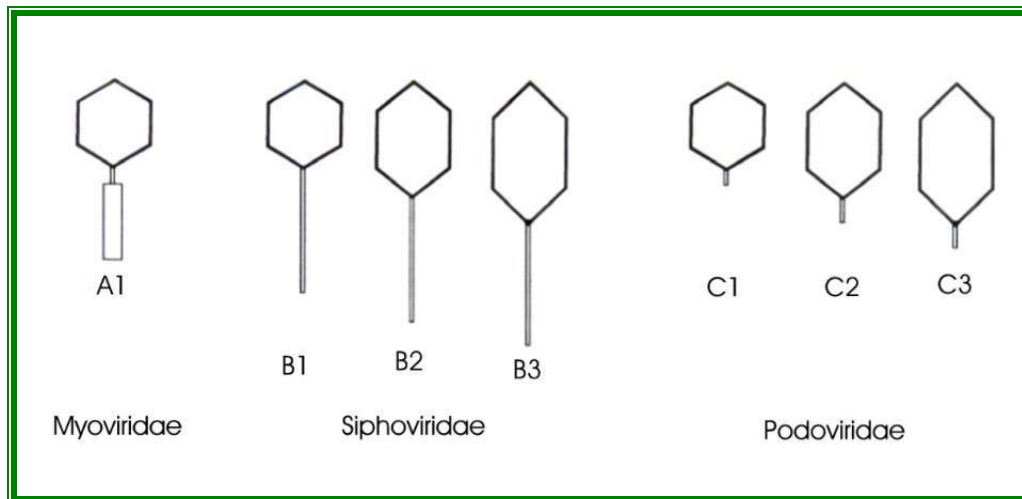


**Fig. 5:** Tipos morfológicos básicos de bacteriofagos, según Bradley (1967).

**Tabla 2:** Grupos morfológicos básicos de bacteriofagos y tipos de ácidos nucleicos (Bradley, 1967).

Grupo	Descripción	Tipo de ácido nucleico
<b>A</b>	Cola contráctil	ADN doble cadena
<b>B</b>	Cola larga no contráctil	ADN doble cadena
<b>C</b>	Cola corta no contráctil	ADN doble cadena
<b>D</b>	Sin cola, capsómeros grandes	ADN simple cadena
<b>E</b>	Sin cola, capsómeros pequeños	ARN simple cadena
<b>F</b>	Sin cabeza, filamento flexible	ADN simple cadena

Una clasificación más reciente es aquella propuesta por Ackermann (1987) (Jarvis, 1989), en la cual los tres grupos básicos de Bradley (A, B y C) se organizan en las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, respectivamente (Fig. 6).



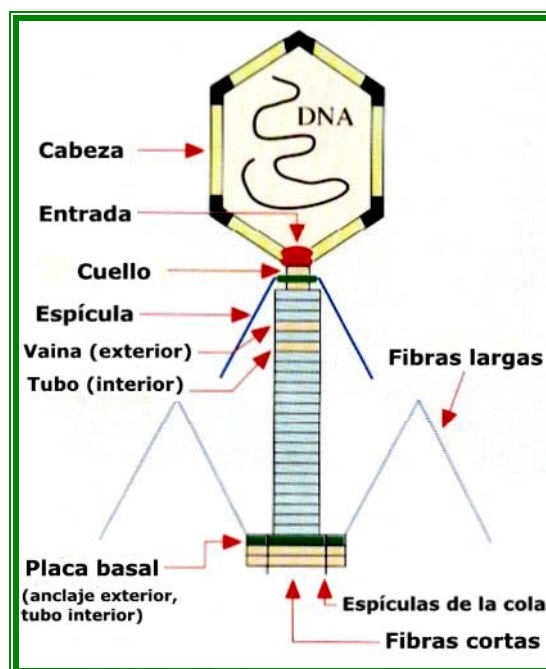
**Fig. 6:** Familias y morfotipos básicos de fagos de bacterias lácticas, según Ackermann y col. (1984).

### Bacteriofagos de bacterias lácticas

Los fagos de las bacterias lácticas pueden clasificarse teniendo en cuenta distintos criterios:

- × **Según el espectro de huéspedes:** este tipo de clasificación carece de importancia taxonómica, pero resulta de gran utilidad desde el punto de vista tecnológico ya que, conociendo el grupo de cepas sensibles a un determinado bacteriofago, se hace posible implementar medidas de control adecuadas (Neve, 1996).
- × **Según el perfil proteico:** mediante electroforesis de las proteínas de la cabeza y la cola se obtienen patrones característicos, que resultan similares para fagos morfológicamente relacionados (Neve, 1996).

× **Según la morfología:** a través de técnicas de microscopía electrónica se pueden determinar características morfológicas (forma y dimensiones de la cabeza y la cola), así como la presencia de estructuras características (collar, placa basal, fibras, etc.). Los fagos de las bacterias lácticas están compuestos por una cabeza y una cola (estructura binaria), las cuales están constituidas por una serie de proteínas. Las cabezas pueden ser isométricas o elongadas (prolatas). En su interior contienen una molécula lineal de ADN doble cadena, cuyo tamaño varía entre 18 hasta más de 130 kb (Neve, 1996). La cola es un tubo pequeño que se une a la cabeza; a veces a través de un collar; y puede ser una estructura rígida o flexible. Su longitud puede variar entre 24 hasta más de 500 nm. Algunas colas poseen vainas contráctiles, mientras que otras carecen de éstas. La placa basal es una estructura compleja adicional que puede o no estar presente, y tiene como función la unión o anclaje del fago a la célula huésped, para lo cual puede poseer fibras (Fig. 7).



**Fig. 7:** Morfología básica de los fagos de bacterias lácticas.

× **Según la taxonomía:** teniendo en cuenta la clasificación de Bradley, los fagos de bacterias lácticas pertenecen a los tres primeros grupos:

✓ **Grupo A:** constituido por fagos de cabeza hexagonal, elongada o no, cola con vaina contráctil, usualmente rígida, pudiendo contener apéndices como fibras o estructuras terminales.

✓ **Grupo B:** formado por fagos de cabeza hexagonal, cola larga y flexible, sin vaina contráctil, y con o sin apéndices terminales.

✓ **Grupo C:** fagos de cabeza hexagonal, cola corta, sin vaina contráctil, con o sin estructuras terminales.

Si se tiene en cuenta la clasificación de Ackermann (1987), los fagos de las bacterias lácticas estudiados hasta este momento pertenecen a los morfotipos A1 de la familia *Myoviridae* (cola contráctil), B1 y B2 de la familia *Siphoviridae* (cola larga, no contráctil), C2 y C3 de la familia *Podoviridae* (cola corta, no contráctil) (Fig. 7).

× **Según estudios serológicos:** consiste en enfrentar las partículas fágicas a antisueros específicos, y agruparlas de acuerdo a su capacidad de ser neutralizadas por determinados antisueros.

Las proteínas fágicas estructurales son inmunogénicas, y poseen sitios de reconocimiento específicos, que pueden ser revelados mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales. Estos antisueros (que son los que contienen los anticuerpos), son usados para realizar ensayos de *neutralización*, mediante técnicas como Western blot, ELISA y microscopía inmunoelectrónica. Cuando estos antisueros son incubados con las partículas virales, se produce la neutralización entre los antígenos fágicos y los anticuerpos del antisuero, la cual se traduce en una inactivación de las partículas fágicas, que se visualiza en una disminución del título fágico (Jarvis, 1989; Neve, 1996).

× **Según la homología del ADN:** los estudios de hibridación ADN-ADN permiten agrupar los virus genéticamente relacionados, y de esta manera clasificarlos en subgrupos morfológicos de acuerdo a similitudes a nivel molecular (Jarvis, 1989; Neve, 1996).

× **Perfiles de restricción:** las endonucleasas de restricción, también llamadas enzimas de restricción, son aquellas enzimas que degradan el ADN fágico luego de que éste ha sido inyectado en la célula bacteriana hospedadora, y forman parte del sistema de fago-resistencia bacteriano. Estas enzimas cortan el ADN en el interior de la secuencia de reconocimiento, o en un sitio inmediatamente adyacente a esta secuencia.

Las enzimas de restricción son poderosas herramientas en el desarrollo de la biotecnología genética, y están disponibles a nivel comercial. Luego de que estas enzimas cortaron el ADN fágico in vitro, estos fragmentos pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa, y de esta manera se realizan los perfiles de ADN, que son específicos para cada tipo de fago (Neve y Teuber, 1991; Neve, 1996).

× **Mecanismos de empaquetamiento (cos- y pac- sites)- Mapas de restricción:** como se describió más arriba, a través del uso de enzimas de restricción es posible determinar la ubicación relativa de los sitios de corte/reconocimiento en el genoma. Estos datos permiten la construcción de mapas de restricción. Muchos fagos poseen moléculas lineales de ADN, las cuales pueden circularizarse por medio de pequeñas regiones de ADN simple cadena, que están localizadas en los extremos de la molécula. Estas regiones son conocidas como “extremos cohesivos” (*cos end* o *cos site*), y los sitios de reconocimiento de un mapa de restricción están orientados hacia estos extremos (posición “cero” en el mapa). Algunos fagos carecen de ADN con extremos cohesivos, por lo tanto carecen de moléculas circularizadas, y al microscopio óptico sólo se observan moléculas lineales de ADN (*pac site*) (Neve y Teuber, 1991). Los fagos estudiados se dividen en dos grupos según su mecanismo de empaquetamiento, el cual se establece en base a la presencia o ausencia de extremos cohesivos en sus

extremos. Este método consiste en comparar los patrones de restricción del ADN viral tratado y sin tratar con ADN ligasa. En el caso de fagos con extremos cohesivos aparece un nuevo fragmento en las muestras de ADN ligado al mismo tiempo que desaparecen dos bandas presentes en las muestras no ligadas, siendo la suma de sus tamaños igual al del nuevo fragmento.

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

### **Ciclo vital de un fago**

Los fagos pueden clasificarse en virulentos (líticos) o temperados, según el tipo de desarrollo que ocurra dentro de la célula huésped. Aquellos fagos que infectan y lisan la célula hospedadora se denominan **fagos líticos o virulentos**, mientras que aquellos que no producen la lisis de la célula bacteriana que los hospeda pero, en cambio insertan su genoma en el cromosoma bacteriano, son conocidos como **fagos temperados** (Fig. 8).

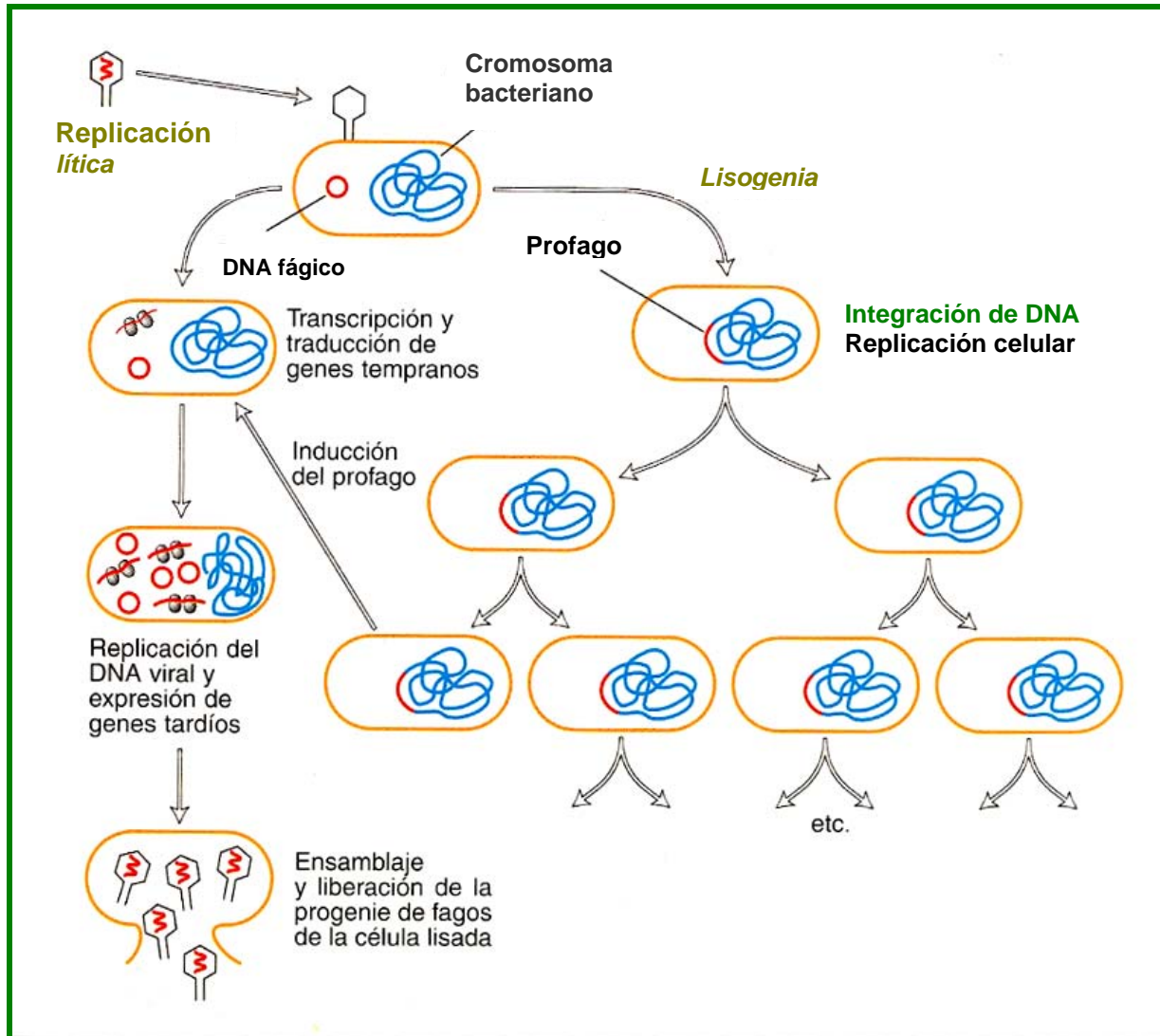


Fig. 8: Ciclos lítico y lisogénico de un fago.



### **Ciclo lítico**

La propagación de un fago virulento se realiza mediante un ciclo de multiplicación fágica denominado lítico o vegetativo, y tiene como resultado la liberación de una nueva progenie de partículas fágicas infectivas (Fig. 9). Los pasos de este ciclo son:

× **Adsorción:** El ciclo lítico se inicia a través de la adsorción de un fago a la superficie (pared celular) de una bacteria sensible, denominada “hospedador homólogo”. Este es un evento altamente específico, que depende de la presencia de receptores adecuados ubicados en la pared celular bacteriana. Los fagos se adsorben a la célula por medio de la cola, la cual generalmente posee una placa basal y estructuras adicionales como fibras, que otorgan estabilidad a esta unión. En otras palabras, la unión entre el fago y su receptor en la célula bacteriana es del tipo llave- cerradura (Neve, 1996).

Con frecuencia, la adsorción consta de dos etapas; la primera reversible y la segunda irreversible. Luego de una primera unión reversible a la pared celular, el fago c2 del *Lactococcus lactis* C2 se adsorbe en forma irreversible a una proteína ubicada en la membrana celular (conocida como “proteína de infección por fagos”: PIP) (Valyasevi y col., 1994; Josephsen y Neve, 1998).

La adsorción de los fagos de lactococos ha sido estudiada mediante microscopía electrónica, detectándose dos mecanismos: la mayoría de los fagos se adsorbe a un número limitado de receptores que se encuentran distribuidos sobre toda la cubierta celular, mientras que unos pocos fagos muestran una adherencia homogénea a lo largo de toda la superficie celular (Valyasevi y col., 1991).

× **Inyección del ADN viral:** Luego de la adsorción del fago a una célula sensible, el ADN fágico es inyectado desde la cabeza a través de la cola hacia el interior de la célula bacteriana, mientras la partícula fágica vacía o “fantasma” queda en la superficie externa de la bacteria (Neve, 1996). Debido a que la adsorción y la inyección del ADN viral son eventos que ocurren casi simultáneamente, en algunos casos es complicado establecer dónde

termina una etapa y comienza la siguiente. Esto acarrea ciertas dificultades para establecer la participación de ciertas estructuras moleculares en una u otra etapa (Valyasevi y col., 1991; Valyasevi y col., 1994). En algunos sistemas en particular se ha estudiado la influencia de ciertos factores como la temperatura de incubación, el contenido de energía (en forma de ATP intracelular), la presencia de iones divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  y la participación de estructuras de naturaleza proteica en el proceso de inyección del ADN viral. Estos resultados fueron variables, y dependen del sistema fago- célula hospedadora estudiado (Sechaud y col., 1989; Watanabe y col., 1993; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

La inyección del genoma del fago PL-1 al interior de las células de *Lactobacillus casei* ATCC 27092 requiere energía proveniente de las células intactas. También se ha sugerido que este proceso depende de la maquinaria de síntesis proteica de las células bacterianas hospedadoras. El  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Mg}^{2+}$  son indispensables para muchos fagos que infectan bacterias lácticas, a pesar de que algunos también pueden proliferar en ausencia de estos cationes divalentes. Para el fago LL-H, que infecta al *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* LL23, se ha propuesto que los cationes podrían funcionar como “contraiones” durante la translocación del ADN fágico a través de la membrana celular (Neve, 1996; Alatossava, 1998; Josephsen y Neve, 1998). Un primer trabajo en el fago PL-1, ha mostrado que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son indispensables para completar el ciclo lítico. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , las partículas virales se adsorben normalmente, pero el ADN fágico no es inyectado al interior celular. También se demostró que la inyección del genoma fágico requiere de energía extra, y se observó que existe una buena correlación entre el contenido de ATP intracelular y la inyección del ácido nucleico viral, lo cual determinó los “complejos celulares- fago resistentes a la desorción” (Sechaud y col., 1988).

✗ **Biosíntesis de componentes virales:** Una vez que el ADN fágico ha sido inyectado en la célula bacteriana, el metabolismo normal de la célula se detiene, y toda la maquinaria biosintética bacteriana estará dedicada a sintetizar las nuevas moléculas de ADN del fago (replicación del ADN) y por consiguiente, la síntesis de las proteínas del fago (Neve, 1996). Durante este período, que es denominado “eclipse”, y está definido como el tiempo que

transcurre entre la infección y la aparición intracelular de las primeras partículas infectivas, las moléculas precursoras de la progenie viral se encuentran en etapa de síntesis o dispersas en el interior de la célula. Dicha fase está contenida dentro del “período de latencia”, que se conoce como el tiempo durante el cual el título infeccioso no manifiesta ningún incremento (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

× **Maduración fágica:** Durante esta etapa, las proteínas estructurales se ensamblan y las nuevas moléculas de ADN fágico son empaquetadas en el interior de las cabezas, y finalmente se obtienen las partículas virales completas (Neve, 1996). El proceso de ensamblaje es de tipo secuencial, y se sintetizan en forma aislada las colas y las proteínas de la cápside. No se sabe con certeza si la cabeza se forma en primer lugar por polimerización de las subunidades proteicas y luego se incorpora el ADN, o si éstas se polimerizan en torno al ADN superenrollado. Lo que sí se conoce es que la cola se inserta sólo cuando se completa la formación de la nucleocápside (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

× **Lisis de la célula bacteriana huésped:** El ciclo lítico se completa cuando se produce la ruptura de la pared o lisis celular, a través de enzimas llamadas lisinas, que están codificadas en el genoma fágico. Las nuevas partículas virales ya ensambladas son liberadas al medio (por ej., al suero de queso cuando se produce en la industria; o hacia el medio de cultivo si se realiza en el laboratorio) (Garvey y col., 1995). El período durante el cual se produce la liberación de la progenie viral se conoce como “período exponencial”; mientras que el número de partículas fágicas liberadas a partir de una única célula infectada se denomina **burst-size** o número de explosión. Estos valores son característicos de cada sistema cepa sensible-fago lítico (Sechaud y col., 1992). Los períodos de latencia para fagos de lactococos oscilan entre 10 y 140 minutos, y sus valores de burst-size de 10 a 400 partículas por centro de infección (Klaenhammer, 1984; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Garvey y col., 1995; Neve, 1996). Para los fagos de lactobacilos, también existen grandes variaciones, con rangos de 40 a 75 minutos para los períodos de latencia y de 80 a 300 partículas virales por centro de infección para el burst-size (Sechaud y col., 1988; Sechaud

y col., 1992; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Los burst-size en estreptococos varían ampliamente, oscilando entre 9 a 105 partículas virales por centro de infección, con un período de latencia promedio entre 40-50 minutos (Klaenhammer, 1984). Un trabajo realizado sobre fagos autóctonos de *S. thermophilus* arrojó resultados un tanto diferentes a los mencionados en la bibliografía. Según éste, el período de latencia de estos fagos osciló entre 20 y 40 minutos, y los valores de burst-size oscilaron entre 300-600 partículas virales por centro de infección (Binetti, 2001).

El ciclo lítico de un fago se ve afectado por factores ambientales (pH, temperatura, etc.), y por las condiciones de la célula huésped (por ej., el estadio de desarrollo del cultivo bacteriano). Con respecto a la influencia de la temperatura de incubación sobre la propagación de las fagos, se ha demostrado que la óptima suele ser cercana la temperatura óptima de desarrollo de la célula hospedadora, pero aún a valores extremos, se observa propagación de las partículas virales (Klaenhammer, 1984; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

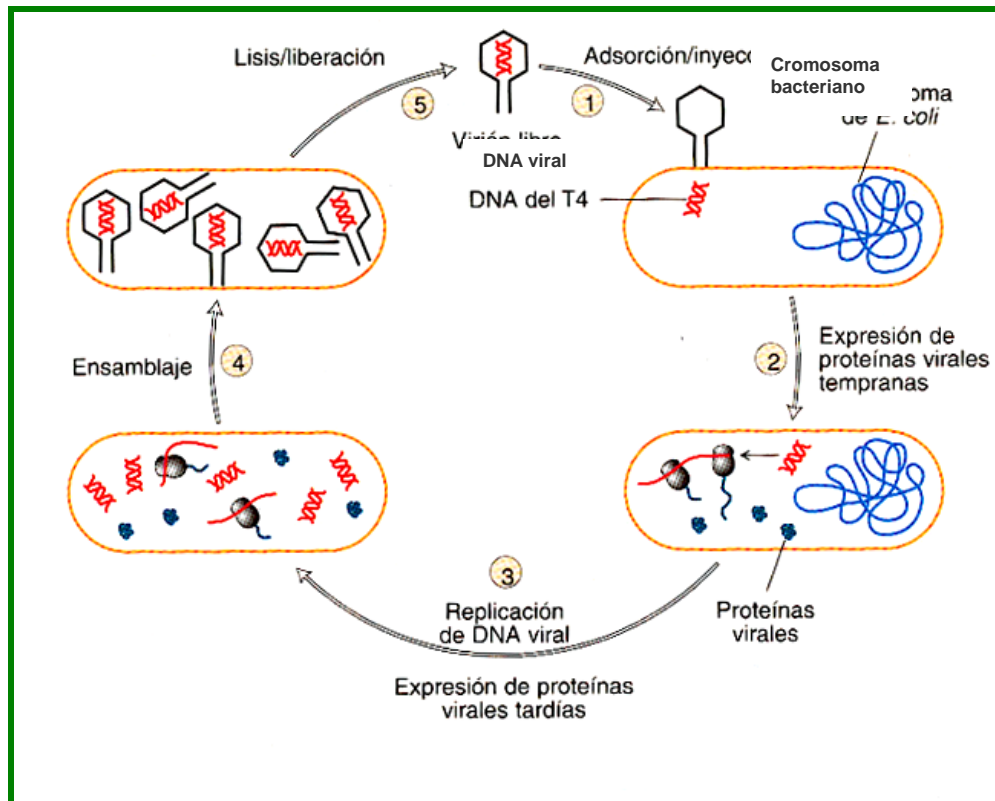


Fig. 9: Ciclo lítico de un fago.

### Ciclo lisogénico

El ciclo lisogénico es una vía alternativa de replicación fágica. Los pasos involucrados en la adsorción del fago a la célula sensible y la inyección del ADN, son similares a los que se producen durante el ciclo lítico, pero en este caso el ADN viral se inserta en el cromosoma bacteriano. Esto ocurre por medio de una recombinación recíproca única que se produce en una región específica de homología entre el ADN viral y el ADN de la célula hospedadora, la cual es conocida como sitio de unión *attP* (phage attachment site) en el genoma fágico, y como *attB* (bacterial attachment site) en la célula bacteriana. Como consecuencia de esto, no se produce la lisis celular y el ADN del fago se comporta como un gen más dentro del cromosoma bacteriano, replicándose en forma sincronizada con éste,

dando origen a una progenie de células lisogénicas. Estos fagos en estado de latencia se conocen como “profagos” o “fagos temperados”, y las células bacterianas involucradas se conocen como “cepas lisógenas”. Se ha demostrado que algunos lactococos son portadores de más de un profago, lo que se denomina **multilisogenia**. La escisión del profago del cromosoma bacteriano, con la subsiguiente liberación del fago temperado puede ocurrir espontáneamente, o mediante inducción con luz UV, a través de un tratamiento con agentes mutagénicos como la mitomicina C, o por calor (Josephsen y Neve, 1998). Los fagos temperados liberados de las células huéspedes pueden relisogenizarse o proliferar como fagos líticos sobre cepas sensibles, denominadas “cepas indicadoras” (Neve, 1996).

El estado de lisogenia podría contribuir a aumentar la insensibilidad fenotípica hacia fagos, ya que aquellos fagos con características similares a las del profago no podrán superinfectar a la cepa lisógena (Josephsen y Neve, 1998). Se ha observado que la lisogenia está muy difundida en el género *Lactococcus*, así como también entre las especies de *Lactobacillus* (Sechaud y col., 1988; Jarvis, 1989; Josephsen y Neve, 1998).

### **Problemática en la industria láctea fermentativa**

Los fagos que infectan a las bacterias integrantes de los cultivos iniciadores representan una de las principales causas de los problemas de acidificación en la industria láctea mundial, ocasionando serias dificultades tecnológicas (Jarvis, 1989; Brüsow y col., 1994, Bruttin y col., 1997). La actividad acidificante de las bacterias lácticas es la propiedad de mayor importancia desde el punto de vista industrial debido a que, junto con la actividad proteolítica, orienta la selección de los fermentos de acuerdo a las características deseadas para el producto final (Tamine, 1993). Estos parámetros se ven afectados en gran medida por la presencia de bacteriofagos.

En la actualidad, debido a las exigencias de productos de calidad constante, la estandarización de los procesos y la mayor demanda de productos lácteos, las industrias deben trabajar con mayores volúmenes de leche, en forma continua en algunos casos,

aumentando de esta manera el riesgo de problemas originados por fagos. Esto ha determinado el reemplazo de los fermentos naturales por starters constituidos por unas pocas cepas seleccionadas (fermentos comerciales), que aseguren velocidades de acidificación constantes. En general, estos cultivos resultan más sensibles al ataque por fagos, pudiéndose comprometer seriamente su actividad acidificante (Ottogalli y Galli, 1967; Neviani, 1993; Reinheimer y col., 1997). Además, la coexistencia en una misma planta industrial de diferentes líneas de producción que emplean ambos tipos de fermentos incrementa aún más los riesgos de que se produzcan estos problemas.

Los fagos pueden ingresar a una elaboración vehiculizados por el aire, por insumos que son adicionados en la elaboración, por el personal o por la leche utilizada como materia prima. De todas éstas, las dos vías más importantes responsables de la contaminación de bacteriofagos en una planta láctea son el uso de cultivos con cepas lisógenas y la presencia de bacterias lácticas en la leche cruda. En estos dos casos, las cepas salvajes de bacterias lácticas liberan, bajo ciertas condiciones, profagos que estaban contenidos en su cromosoma, los cuales pueden infectar cepas sensibles, como las del cultivo iniciador. La mayoría de los lactococos son lisógenos, y también se ha observado en lactobacilos (Josephsen y Neve, 1998). En aquellas cepas donde existe lisogenia, el profago posee una elevada homología con fagos líticos, y al ser liberado han demostrado en muchas oportunidades, poseer un amplio rango de hospedadores (Neve, 1996; Josephsen y Neve, 1998). De esta manera, el sustrato de las fermentaciones lácticas, la leche cruda, se encuentra naturalmente contaminado en bajas concentraciones con estos profagos, lo cual puede ser el origen a partir del cual se desarrollen concentraciones líticas de los bacteriofagos. Los niveles pueden aumentar a concentraciones importantes en el suero de quesería, siendo éste la causa más importante de diseminación de fagos en una planta. (Neve, 1996).

Los procesos de la industria láctea fermentativa originan un ambiente sumamente favorable y altamente dinámico para la interacción entre bacterias y fagos. Cuando una bacteria y un fago están presentes, se producen inevitablemente en el proceso de

fermentación una serie de eventos que concluyen con la aparición de una población de fagos dominantes. De esto se deduce que la infección por fagos no puede ser combatida mediante un solo mecanismo.

### **Bacteriofagos de bacterias lácticas termófilas**

Como consecuencia de su importancia económica, los fagos de las bacterias lácticas han sido aislados y estudiados por décadas (Alatossava, 1998). Tradicionalmente, la industria láctea mundial ha utilizado cultivos iniciadores mesófilos, y por este motivo, la especie más afectada por infecciones fágicas fue *Lactococcus*. La existencia de fagos de bacterias lácticas mesófilas se conoce desde los años '30, por lo que los estudios más exhaustivos se centraron en fagos de este género (Keogh y Pettingill, 1983; Klaenhammer, 1984; Valyasevi y col., 1994; Alatossava, 1998). Los primeros reportes de accidentes ocurridos en la industria láctea a causa de bacteriofagos de bacterias lácticas termófilas se realizaron recién en los años '50, cuando dos investigadores finlandeses observaron los problemas que se producían en la elaboración del queso Emmental, donde se utilizan cepas de BAL termófilas como *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* y *L. lactis*. Siguen siendo muy escasas las investigaciones realizadas en relación a las especies de este grupo (Deane y col., 1953; Sechaud y col., 1988; Reinbold y Reddy, 1993; Brüsow y Bruttin, 1995; Alatossava, 1998; Brüsow y col., 1998).

La mayor parte de los aislamientos de fagos de bacterias mesófilas fueron realizados a partir de sueros de elaboraciones queseras que mostraron problemas de acidificación (Oram y Reiter, 1968; Jarvis, 1989; Sechaud y col., 1989), mientras que los de bacterias termófilas se realizaron a partir de elaboraciones de yogur (fagos de *S. thermophilus* y de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) o de quesos tipo suizo e italianos (fagos de *Lactobacillus*, en especial *Lb. helveticus* y de *S. thermophilus*) (Rajagopal y Sandine, 1989; Sechaud y col., 1989; Larbi y col., 1992; Shieh y col., 1992; Foschino y col., 1995; Suárez y col., 2002).



Antiguamente, los cultivos termófilos compuestos por *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, eran usados fundamentalmente en la elaboración de yogur, y raramente se los asociaba a infecciones fágicas. La explicación que se daba a esta observación era que en el proceso de elaboración de yogur no se genera suero, que es el principal vehículo de los fagos, además de que la leche es sometida a temperaturas de 80-90 °C, que podrían reducir la carga viral. En cambio, la industria quesera utiliza temperaturas más bajas (pasteurización del tipo 73 °C durante 16 segundos), que no impiden la viabilidad de los bacteriofagos (Terzaghi y Sandine, 1975; Peitersen y col., 1991; Zottola y Marth, 1996).

### **Fagos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***

En las últimas décadas se ha visto un notable incremento en la producción de yogur y quesos que utilizan starters de bacterias lácticas termófilas, dando como resultado un aumento en problemas de acidificación causados por fagos que atacan a estas bacterias. Esta problemática ha llevado a los investigadores a estudiar con mayor detenimiento a estos fagos, aunque todavía hoy la información que se posee es ciertamente bastante escasa. Así, los fagos más estudiados dentro de este grupo son aquellos que atacan cepas de *S. thermophilus* (Klaenhammer, 1984; Jarvis, 1989; Suárez y col., 2002). Más escasa aún es la información acerca de los fagos de lactobacilos, y en particular de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La mayoría de los fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* pertenecen al grupo B1 según la clasificación de Ackermann, y en general poseen colas no contráctiles, aunque se han descrito algunos fagos de ambas especies con colas contráctiles (Cluzel y col., 1987; Jarvis, 1989). Estas características son avaladas por un estudio realizado a partir de la observación mediante microscopía electrónica de cinco fagos líticos de *Lb. bulgaricus* (c3, c5, lb4, ch2 e y5). El fago c3 se distingue del resto por poseer dimensiones menores de su cabeza y cola. Se ha observado un collar en los fagos ch2 e y5. La cola de los cinco fagos presenta un estriado regular (Accolas y Spillman,

1979). Un estudio realizado sobre ocho fagos de *Lb. helveticus* muestra que todos ellos poseen colas contráctiles, característica que los distingue de los fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, que como fue mencionado más arriba, poseen colas no contráctiles (Jarvis, 1989; Sechaud y col., 1992).

Se han encontrado características similares entre el fago LL-H de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y el fago ch2 de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Jarvis, 1989) en cuanto a su morfología (tamaño de la cabeza de 50 nm, cola larga no contráctil de 170-180 nm y genoma de 34-35 kb). Muchos fagos son capaces de infectar tanto cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, lo que indica que el rango de huésped de estos fagos no se limita necesariamente a cada especie (Accolas y Spillman, 1979).

### **Mecanismos de fagorresistencia**

Las bacterias lácticas han estado expuestas a los fagos por centenares de años, por lo que han desarrollado una serie de sistemas de defensa efectivos contra el ataque de éstos (Neve, 1996; Josephsen y Neve, 1998). Estos mecanismos de defensa fueron extensamente estudiados en lactococos, pero han sido menos investigados en otras especies bacterianas como *S. thermophilus* o *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Oberg y Broadbent, 1992; Forde y Fitzgerald, 1999). Los mecanismos de fagorresistencia pueden ser agrupados de la siguiente manera:

- Interferencias en la Adsorción;
- Bloqueo de la inyección del ADN fágico;
- Sistemas de Restricción/ Modificación (R/M);
- Infección Abortiva (Abi);
- Inmunidad lisogénica;

- Mecanismos de resistencia diseñados por ingeniería genética.

El ataque de fagos en la industria láctea fermentativa, y sus drásticas consecuencias en la producción casearia, leches fermentadas y otros productos que utilizan cultivos iniciadores, ha estimulado la investigación de las interacciones entre fagos y cepas sensibles, siendo aún más interesante el desarrollo de tecnología molecular en los últimos años con la finalidad de conocer más profundamente estas interacciones. Gracias a estos estudios, las bases genéticas de los mecanismos de resistencia bacteriana y los mecanismos por los cuales algunas de las bacterias interactúan con los fagos están siendo aclarados. Además, la caracterización molecular de fagos sobre todo a nivel genético, ha progresado mucho en los últimos tiempos, principalmente en fagos líticos y temperados de lactococos, en los cuales se ha logrado obtener las secuencias completas de sus genomas. El estudio de los mecanismos a través de los cuales operan estos sistemas de defensa es necesario para desarrollar estrategias adecuadas con la finalidad de combatir las infecciones fágicas en la industria (Garvey y col., 1995).

Si una célula bacteriana es resistente al ataque fágico, ésta no será un buen modelo para realizar el estudio de las interacciones fago-célula hospedadora. En algunos casos, las cepas resistentes han sido utilizadas para realizar el “curado” (es la eliminación de la información genética extracomosomal, por ej. plasmidial) y estudios de conjugación posteriores, con el fin de revelar la presencia de sistemas de defensa múltiples (Hill, 1993).

### **Interferencias en la Adsorción**

La adsorción es la primera fase de la infección de los fagos a la célula bacteriana. Esta etapa consiste en el reconocimiento y la unión del fago a receptores específicos que están ubicados en la superficie celular.

La inhibición o interferencia en la adsorción es un término usado para describir la resistencia que deriva del fracaso de una partícula fágica de unirse a la superficie de una

célula bacteriana. Esta falla en la adsorción puede ser debida a la falta o un defecto de receptores fágicos en la superficie celular, o a un enmascaramiento físico de estos receptores (Hill, 1993; Garvey y van Sinderen, 1995; Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999). De acuerdo a la bibliografía existente, existen dos mecanismos implicados en este fenómeno; uno es el desarrollo de mutantes fago-resistentes, producidos por mutaciones puntuales espontáneas en el cromosoma bacteriano (sustituciones o inserciones), o mecanismos codificados en plásmidos (Forde y Fitzgerald, 1999). En la mayoría de los mutantes fago-resistentes, esta propiedad fue adquirida a partir de mutaciones puntuales en los genes que codifican para los receptores fágicos. A pesar de esto, en algunos casos se ha vinculado un fenómeno de cointegración plasmídica, es decir que la información acarreada por los plásmidos fue integrada al cromosoma bacteriano, confiriéndole la propiedad de fagoresistencia (Hill, 1993; Garvey y van Sinderen, 1995; Forde y Fitzgerald, 1999). Estos plásmidos suelen transportar información para conferir resistencia a más de un fago, y pueden ser transferidas a otras cepas mediante conjugación (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Garvey y van Sinderen, 1995). Sin embargo, la inherente inestabilidad de estas moléculas puede llevar al desarrollo de cultivos integrados por cepas resistentes y cepas sensibles a un determinado fago. Como aquí los fagos no son eliminados ni destruidos, consecuentemente son capaces de infectar a las bacterias que sean sensibles, y así se propagará de manera normal. Los fagos pueden permanecer en las cepas resistentes, promoviendo la **pseudolisogenia** o el “estado de portador de fagos” (phage carrier state), en el cual coexisten bacteria y fagos líticos. Esta situación puede limitar la gran importancia que posee este mecanismo de defensa bacteriano (Hill, 1993; Forde y Fitzgerald, 1999).

### **Bloqueo de la inyección del ADN fágico**

En este caso, la adsorción se lleva a cabo normalmente, pero el ADN fágico no es inyectado al interior de la célula, produciéndose la interrupción del ciclo lítico.

Luego de ocurrida la exitosa adsorción del fago a la superficie celular, se produce una interacción irreversible, calcio-dependiente, que requiere energía, entre el fago o su ADN y la membrana plasmática de la bacteria, lo que permite que el ADN fágico sea inyectado al interior de la célula bacteriana (Forde y Fitzgerald, 1999). Es posible que esto represente un tipo específico de interferencias en la adsorción, por ejemplo, una inhibición de la etapa irreversible de la adsorción, luego de la cual es inyectado el ADN viral (Hill, 1993). Mediante el uso de microscopía electrónica puede demostrarse que el ADN viral permanece en la cabeza del fago, no observándose las conocidas “partículas fantasmas” (Forde y Fitzgerald, 1999).

En *Lactococcus lactis* C2, la adsorción reversible del fago c2 a la pared celular es seguida de una adsorción irreversible a una proteína localizada en la membrana celular, y conocida como PIP (phage infection protein) (Valyasevi y col., 1991). Un mutante fago-resistente de la cepa C2 que podía aún adsorber al fago c2 carecía de la proteína PIP. Esta proteína está codificada en el cromosoma bacteriano (Josephsen y Neve, 1998). Watanabe y col. (1984) describieron un mutante de *Lactobacillus casei* que permite la normal adsorción del fago PL-1, pero en el cual no se produce la inyección de su ADN.

El primer sistema de bloqueo en la inyección de ADN fágico codificado en un plásmido que fue reconocido fue descrito en el género *Lactococcus* por Garvey y col. (1996), los cuales demostraron la presencia del plásmido pNP40, que codificaba la información para la resistencia hacia el fago c2. Este plásmido también codifica otros mecanismo de resistencia fágica (Garvey y col., 1995).

### **Restricción- Modificación (R/M)**

Luego de producidas tanto la adsorción como la posterior inyección del ADN fágico en forma exitosa, la capacidad de que se complete el ciclo lítico puede ser inhibida por la presencia de mecanismos de restricción-modificación (R/M). Estos involucran la actividad de por lo menos dos enzimas distintas. La mayoría del ADN inyectado al interior celular es digerido por una *endonucleasa* de restricción específica de sitio, que está codificada en el

cromosoma bacteriano, pero la célula posee un sistema de autoprotección para evitar que esta enzima actúe sobre su propio ADN, lo que se lleva a cabo mediante otra enzima, una *metilasa*, que modifica el ADN bacteriano. La intensidad de la restricción depende del sistema y del fago; en general la eficiencia de plaqueo (EOP: es la relación entre los títulos de la cepa fago-resistente y la cepa sensible) del fago disminuye en forma logarítmica a medida que aumenta el número de sitios en la molécula de ADN viral (Hill, 1993; Forde y Fitzgerald, 1999). Paradójicamente, este sistema de defensa bacteriano es el más poderoso y el más frágil, como consecuencia de su simplicidad. Así como el ADN celular es protegido de la degradación por parte de la endonucleasa, un pequeño número de copias del genoma fágico puede escapar a su acción mediante una modificación en su ADN, por lo tanto, este no será identificado como material extraño, y por consiguiente no será degradado y podrá continuar con el ciclo lítico. Estos fagos modificados pueden ser ahora protegidos por metilación, al igual que la célula hospedadora. Además, todos aquellos fagos que no posean los sitios apropiados de reconocimiento no serán afectados por los sistemas de R/M (Hill, 1993). Otras modificaciones que pueden llevar a un determinado fago a ser inmune a este sistema son la modificación de bases, la producción de proteínas que inhiban las endonucleasas celulares, e incluso la adquisición de genes que codifiquen para metilasas (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). A pesar de que se han estudiado muchos sistemas de R/M, las bases moleculares de su regulación son todavía escasas. En aquellos casos en los cuales ha sido posible estudiarlos a este nivel, se observó que la expresión de estos genes está fuertemente controlada, y que existe una íntima conexión entre los genes que codifican para las endonucleasas (de restricción) y los que codifican para las metilasas (modificación) (Forde y Fitzgerald, 1999).

Los sistemas de R/M se han clasificado en cuatro grupos, según estudios estructurales de las enzimas y las secuencias de ADN que reconocen (Garvey y van Sinderen, 1995; Forde y Fitzgerald, 1999). El Tipo II posee, en general, requerimientos sencillos de cofactores, y su sitio de corte es o se encuentra cerca de su sitio de reconocimiento, y tiene una organización genética bastante sencilla. En contraste, los Tipos

I, III y IV pueden ser multifuncionales, poseer varias subunidades, requerimientos complejos de cofactores y/o actuar en sitios al azar provenientes del sitio de reconocimiento. La gran mayoría de las BAL estudiadas posee sistemas de R/M de Tipo II (Garvey y van Sinderen, 1995; Forde y Fitzgerald, 1999) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Características de los sistemas de Restricción-Modificación en función de las estructuras enzimáticas y las secuencias de reconocimiento y corte (Forde y Fitzgerald, 1999).

Tipo	Organización estructural y genética	Requerimientos de cofactores y características de corte
I	Complejo multifuncional, formado por 3 subunidades responsables de la restricción, modificación y especificidad.  3 genes estructurales separados	Mg <sup>2+</sup> , ATP, AdoMet (S-Adenosilmetionina)  Cortes al azar, a una distancia mayor a 1000 pb del sitio de reconocimiento asimétrico.
II	Enzimas de restricción y modificación separadas  2 genes estructurales separados	Mg <sup>2+</sup> , AdoMet  Corte en el sitio de reconocimiento simétrico o a una distancia fija, mayor a 20 pb del sitio de reconocimiento asimétrico
III	Complejo multifuncional, formado por 2 subunidades responsables de la restricción y la modificación  2 genes estructurales separados contiguos	Mg <sup>2+</sup> , ATP, AdoMet  Corte a una distancia de 24-27 pb del extremo 3' del sitio de reconocimiento asimétrico, metilando sólo una hebra de ADN
IV	Subunidad de restricción con actividad metilasa y subunidad de modificación individual  2 genes estructurales separados	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , AdoMet  Corte a una distancia fija de 14-16 pb del extremo 3' del sitio de reconocimiento asimétrico

Este mecanismo de fago resistencia está ampliamente distribuido en las bacterias lácticas, y generalmente está codificado en plásmidos. Numerosas cepas de lactococos contienen varios sistemas de R/M de distinta especificidad, o también están combinados con otros mecanismos de resistencia, aumentando de esta forma, el nivel de resistencia a fagos (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Garvey y van Sinderen, 1995). También se ha observado este tipo de sistema en *Lb. helveticus* (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Moineau, 1999), en *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994) y en *S. thermophilus* (Larbi y col., 1992; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Moineau, 1999).



## **Infeción Abortiva (Abi)**

Este término abarca a todos aquellos mecanismos de fago-resistencia en los cuales existe una interferencia en el desarrollo intracelular del fago, ya sea en la replicación de su genoma, transcripción, traducción, empaquetado o ensamblaje de las partículas fágicas (Garvey y van Sinderen, 1995; Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999). Los mecanismos de resistencia mediados por Abi culminan con la muerte de la célula infectada, ya que sus funciones vitales se ven dañadas en el ciclo lítico del fago en forma previa a la activación del mecanismo de defensa. Sin embargo, es preferible la muerte de algunas células sobre el incremento de los niveles de partículas virales, ya que la progenie viral no es liberada, o la liberación es mínima, debido a un mecanismo desconocido.

Estos sistemas se manifiestan fenotípicamente a través de una reducción de la efectividad de plaqueo (EOP), una reducción de la eficiencia de los centros de infección (ECOI), y el desarrollo de placas más pequeñas debido a un menor burst size (menor progenie fágica) (Hill, 1993; Garvey y col., 1995; Forde y Fitzgerald, 1999). En la mayoría de los casos estudiados estos sistemas están codificados en plásmidos, habiéndose encontrado sólo 2 sistemas codificados en el ADN cromosómico bacteriano (Forde y Fitzgerald, 1999).

Una característica interesante de los sistemas Abi, que lo diferencia de los sistemas de R/M, es que los fagos que escapan a su acción no sufren modificaciones en su genoma, de modo tal que podrán ser detenidos o inhibidos en una próxima infección. Estos mecanismos son activos contra la progenie fágica con la misma intensidad con que lo fueron contra la partícula fágica que le dio origen a esa progenie (Hill, 1993).

En el caso del género *Lactococcus*, se han secuenciado 17 genes que codifican para sistemas Abi, estando relacionados entre sí, lo que podría indicar la existencia de una familia de sistemas Abi. A pesar de esto, los mecanismos de acción y regulación son un poco diferentes. Estos se pueden clasificar de acuerdo a si actúan previamente (*acción*

*temprana*) o luego de la replicación del ADN (*acción tardía*). Según este criterio, los mecanismos AbiA, AbiF y AbiK pertenecen a la categoría de sistemas de acción temprana, mientras que los demás sistemas estudiados, para los cuales no se ha detectado una replicación deficiente del ADN fágico, podrían clasificarse como mecanismos de acción tardía (Forde y Fitzgerald, 1999). Los determinantes genéticos de todos los sistemas Abi estudiados en lactococos se caracterizan por presentar un bajo contenido de G+C (24-31%), a diferencia del promedio observado para otros genes de lactococos (37%) (Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999).

Los sistemas Abi presumiblemente entran en juego sólo en aquellos casos en los cuales la infección fágica no pudo ser bloqueada en los pasos anteriores del ciclo, y por esta razón es que la muerte celular se reduce a un valor mínimo (Forde y Fitzgerald, 1999).

### Inmunidad lisogénica

El ciclo lisogénico se produce cuando el genoma fágico que ha sido exitosamente inyectado en la célula bacteriana, se integra por medio de mecanismos de recombinación específica entre dos sitios llamados *attP* en el fago (phage attachment site) y *attB* en la bacteria (bacterial attachment site). La información acerca de las bases moleculares o genéticas para el control y el mantenimiento del estado de lisogenia en las BAL no es demasiado abundante, pero el patrón general pareciera ser similar al del sistema del fago lambda de *E. coli*, el cual ha sido bien caracterizado (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Garvey y van Sinderen, 1995). En general, el estado de lisogenia inmuniza a la célula hospedadora de modo tal de que no será infectada por fagos similares al que acarrea ésta. Algunas cepas poseen más de un fago temperado, lo que se conoce como multilisogenia (Neve, 1996).

El estudio de la lisogenia en BAL es muy importante por varias razones. En la práctica, las cepas lisógenas pueden servir como reservorios de fagos líticos en las plantas de elaboración. Otra razón importante para el estudio de la lisogenia es que ésta constituye una fuente no muy explorada de mecanismo de fago-resistencia, el cual podría prevenir una

superinfección de la célula hospedadora por fagos relacionados o no entre sí (Garvey y van Sinderen, 1995).

Se ha establecido una relación a nivel genético entre algunos fagos líticos y temperados de *Lactobacillus*, *S. thermophilus* y *Lactococcus*, pero en realidad la mayoría de los fagos líticos no están genéticamente relacionados con los fagos temperados. En una serie de trabajos, Shimizu-Kadota y col. demostraron que un fago lítico que infectaba una cepa de *Lb. casei* usada en la elaboración de yakult, y aislado de distintas plantas de elaboración que usaban la misma cepa, derivaba de un fago lisogénico presente en esa cepa. Este fago lítico era similar al fago temperado en cuanto a su morfología, serología, composición proteica y los patrones de restricción de ADN. Aparentemente, el fago temperado sufrió una serie de mutaciones puntuales o transposición de módulos genéticos y así dio origen al fago lítico. Algunos investigadores demostraron la evolución del fago lítico u137 a partir de su progenitor u136, mediante la adquisición de información genética obtenida del cromosoma bacteriano (Garvey y col., 1995). El grupo de homología "a" (basado en estudios de ADN) de los fagos de *Lactobacillus delbrueckii* posee un alto número de fagos temperados además de los fagos líticos. Algunas investigaciones demostraron una probable relación entre los fagos temperados y líticos específicos de *Lb. helveticus*, aunque no se ha evaluado profundamente la homología de los ADN. Otros autores identificaron que dos fagos temperados idénticos de *S. thermophilus* exhibían homología con la región central del genoma del fago lítico P55, que comprendía un 25% de la longitud total de su ADN. Esto sugiere que los fagos líticos derivan de los cultivos lisogénicos, o al menos sugieren que pudo ocurrir una recombinación de módulos entre sus genomas (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Los fagos pueden persistir en el medio ya sea como fagos temperados, mantenidos en los cultivos lisogénicos como profagos, o como fagos líticos en estado de portadores o pseudolisogenia. En esta última situación el fago se multiplica en una pequeña fracción de células sensibles de la población bacteriana. La mayoría de las células bacterianas que conforman el cultivo son resistentes al fago, como resultado de la presión selectiva que se

produce por el contacto continuo con las partículas virales. Estos fagos se mantienen en títulos bajos en el cultivo, gracias a la limitada propagación en las células sensibles (Jarvis, 1989; Josephsen y Neve, 1998).

### Mecanismos de resistencia diseñados por ingeniería genética

Además de los mecanismos naturales de fago-resistencia encontrados en las bacterias lácticas, existen una serie de vías adicionales, mediante las cuales las BAL pueden ser modificadas genéticamente con el objetivo de interferir en el ciclo lítico de los fagos. Con este fin, se han creado varios sistemas de defensa que utilizan tecnología de ADN recombinante del propio fago y funcionan inhibiendo la infección fágica.

La tecnología genética proporciona nuevas oportunidades para construir nuevos sistemas de defensa, aprovechándolos al máximo. Con el tiempo, el uso de ADN recombinante conducirá al desarrollo de cepas resistentes (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Sin embargo, estos mecanismos “no naturales” poseen la desventaja de ser altamente específicos, y por otro lado, la aceptación a nivel industrial y del consumidor de esta tecnología continúa siendo discutida (Forde y Fitzgerald, 1999).

#### × ARN antisentido (Antisense RNA)

Este término describe el ARN producido cuando un promotor es dirigido para realizar la transcripción de la hebra no codificada de un gen. No se conoce bien el mecanismo mediante el cual el ARN antisentido (antisense) interfiere con la traducción del ARNm complementario, pero se cree que se forma una doble cadena inestable entre las hebras *sense* y *antisense* del ARN, la cual es rápidamente degradada. El resultado es que el ARNm es removido antes de que pueda ser traducido para sintetizar la correspondiente proteína, y de esta forma se elimina la capacidad de producir un determinado producto, llevando a un significativo nivel de fago-resistencia por parte de la bacteria, visualizado a través de la

reducción en la efectividad de plaqueo (EOP) y menor tamaño de las placas de lisis (Hill, 1993; Josephsen y Neve, 1998).

La eficiencia en la inhibición requiere una selección cuidadosa de los genes fágicos, y depende del nivel de transcripción de los genes, como así también de la cantidad de ARN antisentido producido. En general, a mayor relación de ARN antisense/ARN sense, mayor es la inhibición (Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999). Resumiendo, esta técnica será más efectiva si: el ARN antisense es expresado a niveles altos; las secuencias de ADN fágico se mantienen estables, y la expresión de los genes es interrumpida de manera tal de eliminar proteínas vitales para el desarrollo del fago (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

La aplicación de este tipo de tecnología, con el objetivo de prevenir la proliferación fágica en las especies de BAL de importancia económica, está actualmente limitada a especies de *L. lactis*. Sin embargo, teóricamente también sería aplicable tanto a *S. thermophilus* como a especies de *Lactobacillus*. Lo más acertado sería utilizar esta tecnología en combinación con los mecanismos naturales de fago-resistencia presentes en las BAL (McGrath y col., 2002).

#### × **Per (Phage encoding resistance)**

Este sistema también está basado en un profundo conocimiento del genoma fágico, y resulta de la presencia de un origen de replicación (*ori*) fágico, en un plásmido multicopia. Cuando un fago ingresa a la célula, comienza el proceso de replicación de su ADN en el *ori*. Sin embargo, cuando el fago infecta una célula bacteriana que es Per<sup>+</sup>, se replica el plásmido portador del *ori* y no el fago. A mayor número de copias del plásmido, mayor es la efectividad de este mecanismo de fago-resistencia, lo que conduce a una disminución dramática en la replicación del ADN fágico. La presencia de este mecanismo se manifiesta mediante una reducción en la efectividad de plaqueo (EOP) y en la disminución del tamaño de las placas de lisis. Hill y col. (1990), introdujeron por primera vez un fragmento de 1,4 kb que poseía el *ori* del fago 50 en *L. lactis* subsp. *lactis* NCK203, incrementando la resistencia de esta cepa a la infección por este fago. Un segundo mecanismo, Per31, fue generado

clonando el ori del  $\Phi$ 31. En un estudio posterior, se usaron en forma exitosa tanto el Per50 como el Per31 como parte de un programa de estrategia de defensa fágica por rotación (PDRS: Phage Defence Rotation Strategy), con el fin de maximizar la resistencia de esta cepa frente a fagos presentes. (Hill, 1993; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Garvey y van Sinderen, 1995; Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald, 1999). Este tipo de sistema también ha sido desarrollado y caracterizado en *S. thermophilus* y *Lb. casei*, además de lo ya descrito para *L. lactis* (McGrath y col., 2002).

× **Sistema suicida disparado por el fago (Phage-triggered suicide system)**

Esta estrategia de fago-resistencia es una combinación de “trampa” fágica y muerte celular programada que imita las características fenotípicas de la infección abortiva (Forde y Fitzgerald, 1999). Es un mecanismo altamente específico, descrito para *Lactococcus lactis* como una “trampa genética”, ya que un promotor fago-inducible (aislado del fago 31), activa un sistema suicida luego de producida la infección. Este sistema suicida está compuesto por el cassette de restricción LlaIR<sup>+</sup>, y es letal frente a una gran cantidad de bacterias Gram positivas. Durante la infección fágica, se produce la activación del promotor fágico inducible que “dispara” la expresión del gen letal bacteriano, llevando tanto a la muerte celular como a la destrucción del genoma fágico (Djordjevic y col., 1997).

La Tabla 4 muestra los distintos mecanismos de fagorresistencia que fueron obtenidos mediante ingeniería genética.

Tabla 4: Mecanismos de fagorresistencia obtenidos mediante ingeniería genética (McGrath y col., 2002).

Mecanismo	Hospedador	Derivado de	Fago tipo
Per	<i>L. lactis</i>	φ50	P335
Per	<i>L. lactis</i>	φ31	P335
Per	<i>L. lactis</i>	ΦTuc2009	P335
Per	<i>L. lactis</i>	φu136	P335
Per	<i>S. thermophilus</i>	φsfi21	–
Per	<i>S. thermophilus</i>	φsfi19	–
Per	<i>S. thermophilus</i>	φO1205	–
Per	<i>S. thermophilus</i>	φ7201	–
Per	<i>Lb. casei</i>	φA2	–
Antisense	<i>L. lactis</i>	φ7-9	ND
Antisense	<i>L. lactis</i>	φF4-1	ND
Antisense	<i>L. lactis</i>	φ31	P335
Antisense	<i>L. lactis</i>	ΦTuc2009	P335
Sistema suicida	<i>L. lactis</i>	φ31	P335

ND: no determinado

### Estrategias para el control por bacteriofagos

De entre todas las industrias fermentativas, la industria láctea parece ser el blanco preferido para el ataque por fagos a las bacterias de los cultivos starters. Las principales razones que justificarían esta situación son en primer lugar, que las fermentaciones son llevadas a cabo en un medio no estéril (leche pasteurizada) y, a menudo, en recipientes abiertos (tinas o fermentadores); y por otro lado, el uso continuado de los cultivos se

constituye en una presencia permanente de células potencialmente sensibles al ataque fágico (Reinheimer, 1994). Por otro lado, el uso de leche cruda sin ningún tipo de tratamiento térmico es muy común para la elaboración tradicional de cierto tipo de quesos. Una vez que el ambiente de producción se ha contaminado por fagos, estos se diseminan fácilmente, particularmente vía aérea y a través de los residuos de suero de quesería. De este modo, cada paso realizado en la manipulación del suero es crítico para la distribución de los fagos. (ej.: separadores del suero, sistemas de drenaje, líneas de llenado). A través de los años, la industria láctea fermentativa ha ido en continuo aumento y con esto, los tiempos de fermentación son cada vez más cortos, y las tinas son reutilizadas más de una vez por día, lo que incrementa las oportunidades para que se produzca el ataque por parte de los fagos a las bacterias usadas en los fermentos (Josephsen y Neve, 1998).

En definitiva, la leche, principal sustrato de las fermentaciones en la industria láctea, contiene naturalmente bacteriofagos, los cuales son capaces de sobrevivir a los tratamientos térmicos como la pasteurización, y también al secado por spray. Aunque estos fagos se encuentren en bajo número en la leche, con el transcurso de la elaboración pueden propagarse sobre las cepas sensibles que formen parte del cultivo starter, y así dar lugar a retrasos o, en casos extremos, inhibición total de la capacidad de acidificación de las bacterias atacadas. Por otro lado, el uso de cultivos lisogénicos puede contribuir al aumento de la población de fagos contaminantes (Klaenhammer, 1984).

### **Medios inhibidores de fagos**

Una etapa previa a la inoculación del cultivo starter en la tina de fermentación, es la obtención y propagación del fermento. A pesar de que se realiza en un sistema cerrado, no es totalmente aséptico y, en consecuencia, el cultivo puede ser atacado por los fagos del medio. Para evitar este problema, se han diseñado medios inhibidores que contienen fosfatos o citratos, que actúan secuestrando cationes divalentes, especialmente el calcio. Cuando el calcio no se encuentra disponible (luego de haber sido quelado por el fosfato), se impide la proliferación de la mayoría de los fagos. La efectividad de este medio dependerá



del tipo y la concentración del agente quelante, del pH del medio, y de los requerimientos específicos de la interacción fago-célula hospedadora.

Otro desarrollo importante en este campo son los medios que contienen fostatos y cuyo pH es monitoreado en forma externa. Existen al menos dos variantes de este sistema: una industria quesera puede utilizar su propio suero y suplementarlo con los ingredientes adecuados, o se puede obtener el medio en polvo y rehidratarlo. Luego de un tratamiento térmico (45 °C, 45 min.), el pH del medio se mantiene alrededor de 6,2 por una inyección continua de NH<sub>3</sub> líquido o gaseoso. A pesar de que este sistema ha sido utilizado de forma exitosa en ciertos países, debe ser asociado a un conjunto de estrategias complementarias con el fin de evitar las infecciones por fagos. Una variante más cómoda de este sistema es aquella que utiliza medios que contienen fosfatos insolubles, evitando el monitoreo externo de pH, y además exhibe una excelente inhibición fágica mientras que estimula la actividad y el desarrollo óptimo de la cepa. (Klaenhammer, 1984; Sandine, 1995; Lerayer y col., 1996; Neve, 1996).

### **Tratamientos térmicos**

Es necesario y recomendable realizar un tratamiento térmico tanto de la leche destinada a la elaboración, como de los medios utilizados para la preparación del cultivo starter, con el objetivo de eliminar o disminuir las probabilidades de encontrar fagos potencialmente líticos en las etapas previas a la fermentación (Everson, 1991; Neve, 1996). El tratamiento recomendado para el medio de cultivo usado para el desarrollo del fermento es de 85 °C durante 30 minutos (Neve, 1996). Algunos fagos resisten los tratamientos térmicos realizados a la leche cruda (termización, pasteurización), y en estos casos, la eliminación completa de estos no será posible, por lo tanto esta podría ser la vía primaria de entrada de fagos a la planta de elaboración (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002).

## **Limpieza y desinfección del ambiente industrial: Tratamientos químicos**

Todo el equipamiento que esté en contacto con la leche usada en la elaboración (tinas, líneas de llenado), debe ser adecuadamente desinfectado, ya sea mediante el empleo de vapor o por medio de agentes químicos. Dentro de estos últimos, el hipoclorito de sodio y el ácido peracético resultaron ser los más efectivos, y por lo tanto, son ampliamente utilizados para realizar la desinfección y limpieza del equipamiento (Bennet, 1954; Neve, 1996). También se usan los alcoholes etílico e isopropílico en la desinfección de superficies y utensilios (Neve, 1996).

El hipoclorito de sodio causa alteraciones estructurales de la partícula viral (cápside) y, posiblemente, se produce la liberación del ácido nucleico fágico al medio, como consecuencia de la ruptura de la cápside que lo contenía. Se desconoce si el ácido nucleico permanece intacto o si sufre alguna alteración, pero hasta ahora no se han observado evidencias de daño alguno (Shröder, 1984; Maillard, 1995a; Maillard, 1995b; Maillard, 1996a; Maillard, 1996b; Maillard y col., 1998). Por otro lado, el ácido peracético produce alteraciones aparentemente tanto a nivel estructural como del ácido nucleico del fago (Shröder, 1984; Maillard, 1996a). Otra ventaja de éste es que no deja residuos, ya que luego de reaccionar con la materia orgánica, se descompone dando oxígeno y ácido acético o sus sales, y además se biodegrada en las aguas residuales (Shröder, 1984).

La manipulación y la propagación de los cultivos starters requiere de un equipamiento adecuado y un meticuloso manejo, el cual debe ser realizado bajo estrictas condiciones de higiene, de manera tal de impedir el desarrollo de fagos y otros microorganismos indeseables. Esta etapa se realiza en tanques perfectamente cerrados, en los cuales se inyecta el fermento asépticamente, con una pequeña presión positiva. El aire que ingresa a este equipo debe ser filtrado previamente (Everson, 1991).

## **Cultivos de inoculación directa**

En el pasado, los fermentos eran producidos en la misma planta de elaboración a partir de cultivos líquidos o deshidratados al vacío. Para esto se necesitaba realizar varios

pasajes del cultivo en volúmenes de leche (usada como medio de propagación de la cepa) cada vez mayores, hasta llegar a un número de células bacterianas suficientes como para poder utilizarlas como cultivo starter en una fermentación. Hoy en día, los fermentos son generalmente elaborados en laboratorios especializados, bajo condiciones cuidadosamente controladas. Luego del desarrollo adecuado de los cultivos, éstos son liofilizados, o concentrados y congelados. Los cultivos de inoculación directa (DVS: Direct Vat Strategy) son muy activos, pero el costo de distribución y almacenamiento (a temperaturas muy bajas), es muy alto, lo que restringe su uso en la industria láctea fermentativa. Este tipo de cultivo presenta ciertas ventajas y desventajas. La gran ventaja de este sistema es que, dado que el desarrollo de los fagos requiere de células en fase de multiplicación activa, al limitar el número de repiques durante la propagación, se disminuye el número de generaciones del cultivo, y como consecuencia, también decrecen las posibilidades de desarrollo del fago. La desventaja que presentan radica en que, como están integrados por células en estado de latencia, tienen una fase lag prolongada (30-60 minutos), y requieren de tiempos más prolongados para alcanzar los niveles de acidez necesarios durante la elaboración (Klaenhammer, 1984; Peitersen y col., 1991; Reinheimer, 1994).

Existe otro tipo de cultivos que son menos costosos, pero también menos activos, por lo que requieren de una serie de propagaciones previas para obtener un número adecuado de células bacterianas activas. Estos son conocidos como cultivos de inoculación semidirecta, y como presentan un número mayor de generaciones bacterianas, aumenta el riesgo de una potencial contaminación del fermento (Klaenhammer, 1984).

### **Cultivos monocepa, multicepa y rotación de cultivos**

Cuanto más simple sea la composición microbiológica del fermento utilizado, mayor atención debe prestarse a la problemática de los bacteriofagos. En el caso extremo de los fermentos monocepa, la entrada de un fago lítico al cual la cepa sea sensible, llevará indefectiblemente a la lisis gradual del cultivo y, en consecuencia, a una pérdida de su

capacidad acidificante (Klaenhammer, 1984; Everson, 1991; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Reinheimer, 1994).

Otra estrategia que puede ser usada con el mismo objetivo, es la rotación de cepas, que está basada en la especificidad que rige la relación célula hospedadora-fago. Para un determinado proceso que utiliza una cierta cepa, se necesitará tener disponibles otras cepas que difieran de la anterior sólo en su sensibilidad fágica, para que las características del producto se mantengan uniformes (Reinheimer, 1994). Estos fermentos están conformados por 3-4 cepas cuidadosamente seleccionadas. Los ciclos del sistema de rotación duran aproximadamente 4 días, luego de los cuales se utiliza otro grupo de cepas, y así sucesivamente. De esta manera, teóricamente se reducen los niveles de partículas fágicas en la planta, ya que al reemplazar la cepa supuestamente atacada mediante la rotación, se impedirá que ese fago siga propagándose. En la práctica, este sistema no resulta tan exitoso. Ya que las cepas que difieren sólo en su susceptibilidad fágicas son limitadas, y además son difíciles de reconocer, inevitablemente los programas de rotación usarán cepas que comparten la sensibilidad por algunos fagos. Por lo tanto, el implemento de este programa de rotación que utiliza gran cantidad de cepas, puede ofrecer escasa protección contra el ataque de los fagos, e incluso puede promover la proliferación y aparición de gran variedad de fagos (Klaenhammer, 1984), además de la falta de uniformidad del producto final por la heterogeneidad de cepas usadas, las cuales poseen distintas propiedades tecnológicas (Moineau, 1999).

Una variante de este esquema fue propuesta por Klaenhammer y col. (1997). La estrategia de rotación está basada aquí en el uso de cepas isogénicas (cepas que poseen idéntico genoma), las cuales contienen distintos sistemas de fago-resistencia codificados en plásmidos específicos que han sido introducidos en estas cepas. Así, combinando diferentes mecanismos de fago-resistencia, en general del tipo R/M y Abi, se logra frenar exitosamente la proliferación fágica. Esta estrategia se conoce como PDRS (Phage Defense Rotation Strategy), y se fundamenta, como ya explicamos, en el empleo de clones obtenidos por conjugación, a los cuales se han incorporado determinados plásmidos que codifican ciertos

mecanismos de resistencia a fagos. Alternando el tipo y especificidad de los distintos mecanismos de defensa, es posible evitar la proliferación fágica, e incluso es posible la eliminación de algunos fagos contaminantes (Sing y Klaenhammer, 1993).

Este modelo de rotación presenta notables ventajas. En primer lugar, la rotación de distintos mecanismos de fago-resistencia puede servir para limitar la aparición de fagos, que de otra manera estarían presentes, ya que se usa una misma cepa todo el tiempo. La elección de varios sistemas de defensa que actúen en distintas etapas del ciclo lítico, optimiza la inhibición de los fagos, así como también minimiza las posibilidades de que aparezcan nuevas especies fágicas en el ambiente. Otra gran ventaja del PDRS radica en la posibilidad de usar en forma continua una misma cepa, conservando las propiedades tecnológicas óptimas para un determinado proceso, obteniendo de esta manera un producto final de calidad uniforme (Moineau, 1999).

Otra posibilidad de combatir este problema puede ser la rotación o diversificación en el esquema de producción, es decir, elaborar varios 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).

### **Obtención de cepas con resistencia fágica mejorada. Transconjugantes.**

Durante las dos últimas décadas, se hizo realidad la posibilidad de investigar los distintos mecanismos de fago-resistencia presentes en las bacterias lácticas gracias a los avances logrados en el estudio de las interacciones fago-célula hospedadora y en el campo de la biotecnología. Estos sistemas codificados en plásmidos también han podido ser caracterizados y transferidos a cepas industriales.

Existen varias técnicas disponibles para transformar las cepas sensibles a fagos en derivados fago-resistentes. La eficiencia del sistema (EOP) permite clasificar los mecanismos de fago-resistencia en tres grandes grupos:

- ✗ Sistemas de resistencia fuerte, muy efectivos, con valores de EOP comprendidos entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$ . Sobre ellos se centra el interés de los tecnólogos para la formulación de nuevos fermentos comerciales.
- ✗ Sistemas de resistencia moderada, los cuales poseen valores de EOP comprendidos entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ . Son útiles si se los emplea en conjunto con un plan de rotación de cultivos adecuados.
- ✗ Sistemas de resistencia débil, caracterizados por valores de EOP entre  $10^{-1}$  y  $10^{-3}$ . Las cepas con estos niveles de resistencia no aportan protección suficiente para ser usadas a nivel industrial.

Además, se ha observado que ciertos sistemas de fago-resistencia son menos eficientes si se los emplea a temperaturas elevadas (mayores a 37°C), de manera que el tipo de fermentación en la que se implementará el cultivo starter integrado por cepas con resistencia mejorada influirá en su modo de acción (Moineau, 1999).

Así, luego de muchos años de estudio en el campo de la genética, fue posible establecer bases sólidas con la finalidad de construir cepas fago-resistentes modificadas genéticamente. Esto se hace posible mediante conjugación, y aparece como una estrategia apropiada para el diseño de cultivos starters comerciales de calidad “food grade” (calidad alimentaria), ya que este es un mecanismo natural de transferencia de genes (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Garvey y van Sinderen, 1995). Estos fermentos poseen un uso bastante difundido y, en ciertos casos, han podido ser implementados en un programa de rotación del tipo PDRS (Peitersen y col., 1991).

Sin embargo, puede presentar ciertos inconvenientes. En primer lugar, muchas cepas comerciales son refractarias a la incorporación de ADN extraño, por lo que se hace imposible la adquisición de nuevos genes. Por otro lado, algunos plásmidos también codifican para otras propiedades importantes (fermentación de lactosa, producción de bacteriocinas, actividad de proteinasa), lo que puede conducir a problemas a nivel

tecnológico. Otro punto a tener en cuenta es la compatibilidad entre los plásmidos foráneos y los ya existentes en la cepa. La cepa modificada genéticamente también puede perder plásmidos que codifican para atributos funcionales fundamentales, como son los que fueron nombradas más arriba, por lo que la estabilidad de estos plásmidos es otro punto crítico que debe controlarse, así como también su efecto sobre aquellas características fenotípicas buscadas a nivel tecnológico, como por ejemplo el desarrollo de la cepa, la producción de acidez, etc (Moineau, 1999).

### **Obtención de mutantes espontáneos**

Los mutantes fago-resistentes o BIM (bacteriophage-insensitive mutants) son aquellas cepas que han sufrido algún tipo de alteración espontánea a nivel celular, de manera tal que se bloquea algún paso en el ciclo lítico del fago (Moineau, 1999). En la mayoría de estos mutantes, se encontró una deficiencia en la adsorción del fago, por lo que se cree que la resistencia deriva de mutaciones puntuales en los genes que codifican para los receptores fágicos (Garvey y col., 1995; Moineau, 1999).

En los mejores casos, estos mutantes conservan las propiedades tecnológicas que posee la cepa sensible de la cual derivan, pero en general esto no ocurre, y estas cepas modificadas espontáneamente también pierden su capacidad de acidificación. Por otro lado, el espectro de especificidad fágica es muy estrecho, confiriendo protección contra unos pocos fagos, y además esta resistencia fágica puede ir desapareciendo gradualmente (Klaenhammer, 1984; Moineau, 1999).

A pesar de esto, en algunos casos se ha observado que la fago-resistencia se ha mantenido durante muchos meses, sin que se haya sufrido ningún ataque fágico (Klaenhammer, 1984), e incluso su uso ha resultado más exitoso que el de las cepas genéticamente modificadas (transconjugantes), cuyo manejo puede resultar conflictivo (Coffey y col., 1998; Quiberoni y Reinheimer, 1999).

### **Cepas insensibles a bacteriofagos (cepas salvajes)**

Existen ciertas cepas que resisten los constantes ataques por parte de todo tipo de fagos, y mantienen esta resistencia por períodos prolongados, aún bajo las condiciones más adversas. Esta resistencia puede ser una característica innata de la cepa, la cual puede poseer de manera natural los mecanismos de defensa necesarios para contrarrestar los continuos ataques fágicos.

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 starters mixtos 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).

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 presente ningún tipo de accidente derivado del ataque por fagos. Sin embargo, recientemente se han encontrado bacteriofagos capaces de infectar las cepas que conforman el fermento, lo que confirma la aparición de nuevos fagos líticos a partir de fagos temperados liberados por cepas lisógenas que forman parte del fermento (Brüssow y col., 1998; Nielsen, 1998).

## **LA ADSORCIÓN: Etapa primaria dentro del ciclo de vida fágico**

### **1- Factores que la influncian**

El ciclo lítico de un fago comienza con la adsorción de éste a receptores ubicados en la pared celular de una bacteria sensible, siendo este proceso altamente específico.



Diversas observaciones demostraron que la adsorción ocurre en dos etapas, la primera de las cuales es temperatura-independiente y reversible, y otra etapa también independiente de la temperatura pero irreversible. Todavía se discute si la segunda etapa no debería considerarse dentro de la etapa de inyección del ADN. De todas maneras, en la práctica este mecanismo es un proceso continuo.

Existen algunos factores que afectan el proceso de adsorción, como la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , la temperatura de incubación, el pH del medio y el estado fisiológico de las células bacterianas. La presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  (o  $\text{Mg}^{2+}$ ), no sólo estabilizaría al ADN enrollado en el interior de la cápside del fago, sino que mejoraría en forma visible la tasa de adsorción, y también controlaría la penetración eficiente del ADN en el interior de la bacteria (Sechaud y col., 1988). En el caso del fago hv de *Lb. helveticus* ATCC 15807 se demostró que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no es necesaria para que se produzca la adsorción ni para que se complete el ciclo vegetativo del fago; mientras que el fago ATCC 15807-B1 depende de su presencia. En este caso, la adsorción se desarrolla normalmente en ausencia de iones calcio pero no se produce la lisis celular. Es posible que para el fago ATCC 15807-B1, el proceso dependiente de este catión sea la inyección del ADN fágico (Quiberoni y Reinheimer, 1998). Lo mismo ocurre para los fagos PL-1 de *Lb. casei*, y para el fago 0448 de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Cluzel y col., 1987; Sechaud y col., 1988). Para el fago PL-1, se ha visto que el  $\text{Ca}^{2+}$  es indispensable para completar el ciclo vegetativo (Watanabe y col., 1993). Idénticos resultados se observaron para el caso de cinco fagos autóctonos de *S. thermophilus*, en donde se vio una normal adsorción seguida de ausencia de lisis celular (Binetti y col., 2002). La presencia de este catión no resultó importante para la adsorción y subsiguiente lisis de células de *Lb. helveticus* CNRS 892 por parte de los fagos 0241 y 832-B1, lisógeno y lítico respectivamente. De todas maneras, el  $\text{Ca}^{2+}$  propició una lisis más rápida y temprana (Sechaud y col., 1989). El receptor del fago 832-B1 es una proteína que forma parte del S-layer del *Lb. helveticus* CNRS 892, y podría ser estabilizado por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Los fagos hv y ATCC 15807-B1 se adsorben sobre las células de *Lb. helveticus* ATCC 15807 incluso a 0 °C, pero la máxima tasa de adsorción se alcanzó a 37 °C. Lo mismo ocurre en el caso de los fagos autóctonos 021-4, 021-5, 031, 031-D, CYM y 0BJ de *S. thermophilus* y para el fago PL-1 de *Lb. casei* (Watanabe y col., 1993; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Binetti y col., 2002).. En el caso de los fagos 021-4, 021-5, 031, 031-D, CYM y 0BJ de *S. thermophilus*, se observó que la máxima adsorción se produjo en el rango de temperatura óptima para el crecimiento de las células de *S. thermophilus* (Binetti y col., 2002). Para el fago PL-1, el número de partículas fantasmas no se incrementó durante la incubación a 0 °C, lo que sugiere que se requiere de bacterias viables para que se produzca la inyección del ADN de este fago (Watanabe y col., 1993).

No existe demasiada información acerca de la influencia del pH en la adsorción fágica. En estudios realizados con los fagos 021-4, 021-5, 031, 031-D, CYM y 0BJ, de *S. thermophilus*, la tasa de adsorción fue muy elevada a pH 4 (95%, excepto para el fago OBJ, que fue de 60%) y fue máxima entre pH 6 y 7 (99%). A pH 3 se vio afectada en forma importante la viabilidad de los fagos. Es interesante observar que el pH óptimo para la adsorción de todos estos fagos, fue el pH normal de la leche, cercano a la neutralidad (Binetti y col., 2002).

La capacidad de adsorción de los fagos hv y ATCC 15807-B1 a células no viables (tratamiento térmico) de *Lb. helveticus* ATCC 15807 fue la misma que para células viables, demostrando que los receptores fágicos son termoestables y que este proceso es independiente del estado fisiológico de las células bacterianas. Idénticos resultados se observaron para los fagos autóctonos de *S. thermophilus* (Quiberoni y Reinheimer, 1998; Binetti y col., 2002). Un estudio de microscopía electrónica reveló que el fago PL-1 se adsorbió en forma exitosa a una suspensión células no viables de *Lb. casei*. (Watanabe y col., 1993).

## 2- Receptores fágicos

La susceptibilidad de una bacteria hacia el ataque de un fago depende principalmente de la capacidad del fago de unirse a sitios específicos en la célula denominados **receptores**.

Como es sabido, las bacterias Gram positivas carecen de membrana externa, que en las bacterias Gram negativas pueden representar hasta un 90% del peso seco de la pared celular. El componente mayoritario de la pared de las bacterias Gram positivas es el peptidoglicano, que representa alrededor de un 50-90% de su peso seco. En las bacterias Gram negativas, el peptidoglicano no está relacionado con las funciones de receptores fágicos, tal vez como consecuencia de que está inmerso en la pared celular, siendo poco accesible, mientras que en las bacterias Gram positivas este componente se relaciona con frecuencia con la actividad de receptor.

Existen otros componentes estructurales de la pared celular de las bacterias Gram positivas, algunos de ellos unidos en forma covalente al peptidoglicano, otros asociados con la pared mediante vínculos más débiles, pero ninguno de estos polímeros (a excepción del T-layer del *Bacillus brevis*), se ha podido obtener en forma aislada, por lo que su integridad depende del peptidoglicano. Estos polímeros incluyen los ácidos teicoicos encontrados en *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*, ácidos teicurónicos en *Bacillus*, cápsulas en *Staphylococcus* y *Streptococcus*, proteínas en *Bacillus* y *Streptococcus*, y carbohidratos en *Streptococcus*. Además de mostrar especificidad inmunológica, estos componentes son, o forman parte de los receptores fágicos en las bacterias Gram positivas (Lindberg, 1973).

## 3- Estrategias de identificación y caracterización de receptores fágicos en bacterias lácticas

La mayor parte de los datos que existen acerca de receptores fágicos de bacterias lácticas corresponden a *Lactococcus*, mientras que existe muy poca información con

respecto a la naturaleza de los receptores fágicos de las bacterias lácticas termófilas, como *S. thermophilus* y *Lactobacillus*.

Los receptores para fagos de lactococos están ubicados generalmente en la pared celular, aunque en el caso del fago  $\phi$ m33 está implicada una lipoproteína de la membrana plasmática del *L. lactis* subsp. *lactis* ML3 (Keogh y Pettingill, 1983; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). En *L. lactis* subsp. *cremoris*, los componentes asociados a la pared celular que juegan algún rol en la adsorción fágica son L-ramnosa, D-galactosamina y D-glucosamina. Se ha demostrado que la ramnosa que forma parte del polisacárido extracelular, es probablemente el sitio de unión principal para algunos fagos específicos de *L. lactis* subsp. *cremoris* KH, junto con la galactosa, que se encontraría en la vecindad del receptor, y aparece con un rol más indirecto pero no menos importante en la adsorción (Valyasevi y col., 1990). Se ha observado que la unión de los fagos P008 y P127 era inhibida cuando las células de *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* F7/2 y *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2-1, respectivamente, eran sometidas a la acción de lizosima, metaperiodato o tratamientos con ácidos, y que el receptor fágico era un carbohidrato que formaba parte del peptidoglicano (Schäfer y col., 1991). Se aisló una proteína cuyas subunidades tienen una masa de 32 kD de la membrana celular de *L. lactis* subsp. *lactis* C2, la cual es capaz de inactivar al fago c2. Curiosamente, esta proteína tiene un tamaño similar a otro proteína inhibidora de otro fago, aislada de la membrana de *L. lactis* subsp. *lactis* ML3 (Oram, 1971).

En *Lb. casei*, la ramnosa también fue identificada como el principal componente del receptor fágico. Para el *Lb. casei* ATCC 27092, los residuos de L-ramnosa y D- glucosa, localizados en el exterior del peptidoglicano, fueron reportados como los componentes más importantes del receptor para el fago PL-1 (Ishibashi y col., 1982).

Estudios realizados sobre paredes celulares de dos cepas de *S. thermophilus*, YSD10 y BJ15 con la finalidad de identificar las estructuras de la pared que participan en la adsorción fágica, llevaron a la conclusión de que estos receptores eran de naturaleza hidrocarbonada y no proteicas, ya que los tratamientos con SDS (dodecil sulfato de sodio) y proteinasa K no modificaron la capacidad de adsorción de los fagos CYM y 0BJ, líticos de *S.*

*thermophilus* YSD10 y BJ15, respectivamente. En cambio los tratamientos realizados con mutanolisina y TCA (ácido tricloroacético) redujeron la adsorción de los fagos a la pared celular. Las experiencias de inhibición de adsorción realizadas con distintos azúcares sugirieron que el fago CYM se adsorbe a una estructura que involucra residuos de glucosamina y ramnosa. La glucosa también podría estar involucrada en los sitios de adsorción. Para el fago OBJ, se vio que los azúcares involucrados en los receptores serían glucosamina y ribosa (Quiberoni y col., 2000). Para el caso de *S. thermophilus* ST 12-5, el receptor para los fagos 021-5, 031 y 031-D, estaría formado por residuos de glucosamina y N-acetilglucosamina (Binetti y col., 2002).

Estudios realizados sobre células de *Lb. helveticus* ATCC 15807, sugieren que los receptores para los fagos hv y ATCC 15807-B1 no son de naturaleza hidrocarbonada (Quiberoni y Reinheimer, 1998).

Considerando la importancia de la resistencia fágica a través del uso de mecanismos que interfieran en la adsorción de los fagos, es necesario llevar a cabo mayores estudios con el fin de caracterizar e identificar la naturaleza exacta y la accesibilidad a los sitios receptores.

Siendo el primer paso en el ciclo infectivo de un fago, la adsorción se presenta como un blanco muy atractivo para interferir en el ciclo lítico de un bacteriofago, y de esta manera desarrollar estrategias para crear cepas starters fago-resistentes, con lo que disminuirían las pérdidas económicas debidas a la existencia de fagos en la industria láctea (Quiberoni y Reinheimer, 1998; Quiberoni y col., 2000; Binetti y col., 2002).

# OBJETIVOS

---

Dada la importancia económica de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como componente de los cultivos starters termófilos en nuestro país, y la escasa información existente sobre su interacción con bacteriofagos específicos, para el presente trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

. Ampliar el conocimiento sobre la interacción entre cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y sus fagos líticos, aislados a partir de accidentes industriales, con la finalidad de diseñar estrategias de defensa en la industria.

### **Objetivos Particulares**

- . Actualización bibliográfica.
- . Caracterización de los primeros fagos autóctonos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aislados en nuestro país, a partir de muestras obtenidas en industrias de la región: estudio de la morfología a través de microscopía electrónica, viabilidad durante la conservación, viabilidad a distintos pH, ciclos de multiplicación fágica (burst size), resistencia térmica y química (efecto de ciertos biocidas sobre la viabilidad fágica), estudios preliminares a nivel molecular.
- . Estudio de la interacción de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con sus fagos líticos: estudio de la calcio-dependencia, caracterización de la adsorción (influencia del calcio, de la temperatura y el estado fisiológico celular) e identificación de receptores.

El análisis de los resultados permitirá un importante aporte de conocimientos sobre este tema, para afrontar un problema de gran importancia en la industria láctea fermentativa, donde las bacterias lácticas termófilas forman parte de los fermentos utilizados en la elaboración de gran variedad de alimentos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## MATERIALES Y METODOS

### 1- Aislamiento de fagos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

#### 1.1- Muestras

Se analizaron tres muestras de yogur enviadas por una empresa láctea de la zona, con el objetivo de monitorear la presencia de fagos. Las mismas se denominaron M1, M2 y M3, y se recibieron en agosto de 1998, diciembre de 2000 y febrero de 2001.

En forma conjunta con las muestras descritas, se recibió un sobre de cada uno de los fermentos liofilizados comerciales, del mismo lote que el utilizado en la elaboración. Estos estaban compuestos por cepas de *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (en proporción 97:3). Los fermentos se denominaron FY (correspondiente a M1) y FI (para las muestras M2 y M3).

#### 1.2- Tratamiento de las muestras sospechosas de contener fagos

Las muestras fueron analizadas y caracterizadas a través de las siguientes determinaciones:

- × Observación microscópica directa (a partir de preparados en gota fresca), con inmersión, contraste de fases y aumento de 1000 x (Microscopio trinocular Jenamed 2. Carl Zeiss-Jena)
- × pH, medido con Peachímetro Orion S 720.
- × Acidez, por titulación potenciométrica de 10 ml de muestra con solución N/9 de NaOH hasta pH= 8,4. El resultado se expresa como °D (grados Dornic). El valor de la acidez se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Acidez Dornic (°D)} = V_{\text{NaOH}} (\text{ml}) \times V_{\text{muestra}} (\text{ml}) \times f_{\text{NaOH}}$$

Luego de realizadas estas determinaciones, las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones de FIL-IDF (Neve y Teuber, 1991), esto es, fueron centrifugadas (3.500 x g, 15 min) y filtradas en esterilidad (membranas MILLIPORE, diámetro de poro de 0,45 µm).

Con el objetivo de diferenciar la presencia de bacteriofagos de otros agentes inhibidores, se calentó una alícuota de cada filtrado a 90 °C durante 15 min. Este tratamiento inactiva los bacteriofagos pero no afecta a los demás inhibidores (por ej. antibióticos). Los filtrados tratados térmicamente se utilizaron en los Test de actividad, Spot test y Test de turbidez, al igual que las muestras no calentadas. Estas pruebas permitieron confirmar la presencia de bacteriofagos.

× **Test de actividad:** para cada uno de los filtrados libres de células se inoculó un cultivo incubado durante 16-18 hs del fermento comercial en 10 ml de LDR (1%), y se les adicionó 0,8 ml de cada filtrado a ensayar. A otra serie de tubos a los que también se inoculó el fermento en la misma proporción, se adicionaron los filtrados tratados térmicamente (90 °C, 15 min). También se preparó un tubo control, el cual sólo fue inoculado con el fermento. Todas las muestras fueron incubadas a 42 °C en baño de agua, y se controló la coagulación en el tubo control a distintos intervalos de tiempo. Cuando ésta se produjo, se extrajeron todos los tubos del baño de agua y se les determinó el pH y la Acidez titulable (°D), con el objetivo de verificar la inhibición de la capacidad acidificante del fermento.

× **Test de turbidez:** se inocularon 0,2 ml de un cultivo incubado durante 16-18 hs del fermento comercial en LDR, en 5 ml de caldo Elliker y de caldo MRS, adicionados de CaCl<sub>2</sub> (10 mM). Se ensayaron los filtrados con y sin tratamiento térmico en ambos caldos, agregando a cada tubo 0,5 ml de los mismos. Se los incubó a 42 °C en estufa, controlándose el aumento de la turbidez, comparándola con los tubos control de cada medio de cultivo, los cuales sólo fueron inoculados con el cultivo obtenido por incubación durante 16-18 hs del fermento.

× **Spot test:** sobre una base de agar Elliker y agar MRS adicionados de  $\text{CaCl}_2$  (10 mM), se agregó una mezcla de 0,4 ml de un cultivo obtenido a partir de 16-18 hs de incubación del fermento en LDR y 4 ml de soft agar (0,6% agar) del medio correspondiente. Se secaron estas placas durante 30 min (en gabinete de aire estéril, equipo de flujo laminar horizontal, CASIBA), y sobre esta base se colocó una gota de cada uno de los filtrados (con y sin tratamiento térmico) y diluciones de los mismos. Una vez que las gotas fueron absorbidas, se incubaron a 42 °C durante 18 hs.

Durante la incubación, las cepas presentes en el fermento forman un césped denso, y en el caso de que existan bacteriofagos o sustancias inhibidoras en los filtrados, aparece un halo de inhibición (zona clara) en la zona donde se depositó la gota.

### **1.3- Aislamiento de diferentes clones de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a partir del fermento**

Con el objetivo de aislar clones de las cepas que constituyen el fermento comercial, se estriaron cultivos (LDR, 18 hs a 42 °C) de cada uno de los fermentos en medios de enriquecimiento para bacilos (agar MRS). Luego de la incubación (48-72 hs a 42 °C), se aislaron 10 colonias (verificándose la morfología al microscopio óptico) que se inocularon en caldo fresco (caldo MRS). Se realizó una incubación de 16-18 hs a 4 °C, y se estrió sobre agar MRS, incubando las placas a 42 °C durante 48-72 hs. Se verificó la pureza de las colonias de cada placa, a través de la macro (observación directa de las colonias) y micromorfología (observación al microscopio óptico). De cada placa se aisló una colonia cuya morfología fuese predominante, se la sembró en caldo MRS y se la incubó 16-18 hs a 42 °C. Este procedimiento se repitió con el fin de asegurar la pureza de los clones (cepas) aislados.

### **1.4- Ensayo de turbidez sobre los clones aislados**

Con cada uno de los clones de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aislados (aproximadamente 5 de cada fermento), se realizó un ensayo de turbidez en medio líquido,

utilizando los filtrados libres de células, con y sin tratamiento térmico, con el objetivo de detectar cepas sensibles o resistentes al/los agente/s inhibidores presentes.

Para esto, se inocularon 0,15 ml de cultivo obtenido por incubación durante 16-18 hs de cada clon en 5 ml de caldo MRS adicionado de  $\text{CaCl}_2$  10 mM (tubo control). En los tubos incógnita se agregó, además de este cultivo, 0,5 ml de los filtrados libres de células con y sin tratamiento térmico, respectivamente. Se incubaron en estufa a 42 °C, observándose periódicamente el desarrollo de turbidez en comparación con los controles. Cuando no se observó diferencia en el desarrollo de esta turbidez, se realizaron dos repiques a partir de la primera serie de tubos, y se siguió el mismo procedimiento.

Esta metodología se realizó con el fin de conocer la naturaleza del agente inhibidor, ya que si en el filtrado existe una inhibición de tipo química, su efecto sería decreciente en los sucesivos repiques, resultando en un crecimiento celular (mayor turbidez) cuando la concentración del inhibidor resultara insuficiente. Por el contrario, si en el filtrado hubiera bacteriofagos, se produciría su propagación (aumento de la concentración fágica), y producirían la lisis de los cultivos.

## **1.2- Spot Test sobre los clones aislados**

Con los clones aislados de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se realizó el Spot test, usando los filtrados libres de células (con y sin tratamiento térmico). Este ensayo se realizó sobre una base de agar MRS-Ca, al cual se agregó una mezcla de un cultivo de cada uno de los clones aislados del fermento (0,4 ml) y MRS soft agar (4 ml). Se dejaron secar las placas así preparadas durante 30 min, y sobre esta base se colocó una gota de cada uno de los filtrados (con y sin tratamiento térmico) y diluciones de los mismos. Una vez que las gotas fueron absorbidas, se incubaron a 42 °C durante 18 hs.

Durante la incubación, los clones de los fermentos forman un césped denso, y en el caso de la existencia de fagos o sustancias inhibidoras en los filtrados, aparece un halo de inhibición (zona clara) en el lugar donde se depositó la gota.

### 1.6- Aislamiento de los fagos

Se eligió un clon sensible (Test de Turbidez y Spot Test) de cada uno de los fermentos, y se realizó el recuento de partículas fágicas por el método de la doble capa agarizada. De acuerdo a ésta, en cajas de Petri estériles divididas en cuartos, se repartió en cada sector 2,5 ml de agar MRS 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, adicionados de cloruro de calcio (10 mM), 1 ml de soft-agar y 100 µl de una suspensión en caldo de un cultivo de la cepa sensible. Dicha suspensión fue preparada a partir de 0,2 ml de un cultivo en LDR (2%, 16-18 hs, 42 °C) en 10 ml de caldo fresco y fueron utilizadas antes de los 15 min siguientes, a fin de evitar un excesivo desarrollo de la cepa.

En cada sector de la placa sobre el que se repartió el medio de cultivo agarizado, se volcó el contenido de los tubos de hemólisis, correspondientes a cada una de las diluciones del fago. Se dejó solidificar y se incubó en microaerofilia (por combustión en recipiente hermético) durante 16-18 hs, a 42 °C.

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

$$\text{Título (UFP/ ml)} = \text{Nro. De placas de lisis} \times f_d \times 10$$

Donde  $f_d$  = factor de dilución

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 caldo fresco. Se dejó difundir las partículas fágicas durante una noche a 4 °C. Se adicionó CaCl<sub>2</sub> (10 mM) y 0,2 ml de un cultivo obtenido por incubación durante 16-18 hs de la cepa en caldo. Se incubó a 42 °C hasta lisis completa. Luego, este lisado fue prefiltrado (prefiltro MILLIPORE) y filtrado (filtro MILLIPORE, diámetro de poro: 0,45 µm) para ser utilizado en un nuevo ensayo de formación

de placas (método de la doble capa agarizada). Estas dos últimas etapas se repitieron dos veces más a fin de asegurar la purificación de los fagos.

Una vez obtenidos los fagos e identificadas las cepas sensibles, se procedió al congelamiento de éstas, a la propagación de los fagos, a su congelamiento y a la posterior caracterización de los mismos.

## **2- Cepas**

Las cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* utilizadas en este trabajo fueron aquellas aisladas a partir de los fermentos comerciales liofilizados usados en elaboraciones industriales que evidenciaron problemas de acidificación. Asimismo, para ciertos estudios en particular, se emplearon cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* de colección, que fueron gentilmente cedidas por el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA- Tucumán- Argentina).

La cepa ***Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V** fue aislada del fermento comercial YSD (compuesto por *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en proporción 70:30) utilizado en una elaboración de yogur. El aislamiento fue realizado en el PROLAIN en el año 1997.

La cepa ***Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>** fue aislada a partir del fermento comercial denominado fermento A (compuesto por *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en proporción 97:3) utilizado en una elaboración de yogur. El aislamiento fue realizado en el año 1998 en el PROLAIN.

La cepa ***Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ib<sub>3</sub>** fue aislada a partir del fermento comercial llamado fermento I (compuesto por *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en proporción 97:3) usado en una elaboración de yogur. El aislamiento fue realizado en el año 2000 en el PROLAIN.

Las cepas ***Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326** y ***Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT** ambas fueron cedidas gentilmente por el CERELA (Centro de Referencia para Lactobacilos- Tucumán- Argentina).

## **2.1- Conservación de las cepas**

Las cepas fueron conservadas por congelamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando como medio LDR o caldo MRS adicionado con 15% de glicerol (como crioprotector).

### **2.1.1- Congelamiento en caldo de cultivo adicionado de glicerol**

Las cepas fueron desarrolladas durante 16-18 hs en caldo MRS a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estos cultivos fueron adicionados al 10% a la solución crioprotectora (caldo adicionado de 15% de glicerol), repartidos en alícuotas de 1 ml en crioviales estériles (capacidad: 1,5 ml), y luego congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.1.2- Congelamiento en leche**

Partiendo de un cultivo de 16-18 hs de la cepa pura en LDR, incubado a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se repartieron alícuotas de 0,2-0,3 ml de este cultivo, completándose con LDR estéril hasta 1 ml y se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.1.3- Reactivación de las cepas**

Las cepas conservadas por congelamiento fueron reactivadas en caldo MRS a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  (24 – 48 hs), luego reinoculadas en caldo para ser utilizadas en los distintos ensayos e incubadas a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16-18 hs.

## **3- Fagos**

Se utilizaron los tres fagos líticos, autóctonos, capaces de infectar cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que fueron aislados en el PROLAIN a partir de las muestras mencionadas en el punto 1.1. Los mismos se identificaron como:

- ✗ **Fago BYM** (cepa sensible: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V) (Stiefel, 2000).
- ✗ **Fago YAB** (cepa sensible: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>).
- ✗ **Fago Ib<sub>3</sub>** (cepa sensible: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ib<sub>3</sub>).

También se utilizaron el fago Ib539, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326; y el fago LL-H, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT, ambos cedidos gentilmente por el CERELA (Centro de Referencias para Lactobacilos- Tucumán) (Tabla 5).

**Tabla 5:** Fagos y sus cepas sensibles usadas en este trabajo.

Cepa sensible	Origen de la cepa	Fago lítico	Tipo de proceso, lugar y año en que se aisló el fago
<i>Lb. delbr. subsp. bulgaricus</i> <b>YSD V</b>	Fermento comercial de yogur	Φ BYM	Yogur, Santa Fe, 1997.
<i>Lb. delbr. subsp. bulgaricus</i> <b>Ab<sub>1</sub></b>	Fermento comercial de yogur	Φ YAB	Yogur, Santa Fe, 1998.
<i>Lb. delbr. subsp. bulgaricus</i> <b>Ib<sub>3</sub></b>	Fermento comercial de yogur	Φ Ib <sub>3</sub>	Yogur, Santa Fe, 2000.
<i>Lb. delbr. subsp. lactis</i> <b>LKT</b>	Alatossava & Phytilla (1980)	Φ LL-H	Fago de colección del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Tucumán-Argentina)
<i>Lb. delbr. subsp. lactis</i> <b>CNRZ 326</b>	Auad, L. (1998)	Φ Ib539	Fago de colección del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Tucumán-Argentina)

### 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 °C y a -80 °C, de los filtrados adicionados de glicerol (15%).



#### **4- Metodología general empleada en el estudio de bacteriofagos**

##### **4.1- Propagación de los fagos**

Los fagos utilizados fueron propagados sobre sus correspondientes cepas sensibles, usando caldo MRS.

Un cultivo obtenido por incubación durante 16-18 hs de la cepa fue inoculado en caldo MRS fresco (adicionado sólo de CaCl<sub>2</sub> 10 mM), y se le adicionó el fago a diferentes dosis infectivas (m.o.i., multiplicity of infection= concentración de partículas virales/ concentración de células bacterianas), variables entre 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> aproximadamente. Asimismo, se inoculó un tubo sólo con la cepa (tubo control), para observar el normal crecimiento de la misma. Los tubos fueron agitados suavemente en forma periódica y examinados durante la incubación a 42 °C (aproximadamente 5 hs). Se eligió el m.o.i. para el que la lisis se manifestó en forma completa y más tardíamente; hecho que aseguró una máxima propagación de las partículas fágicas. El lisado resultante fue prefiltrado y luego filtrado, como se indicara con anterioridad, a fin de eliminar los restos celulares. Estas suspensiones de fagos se utilizaron como stock en todas las experiencias y se almacenaron a 4 °C, -20 °C y -80 °C.

##### **4.2- Titulación de los fagos**

La concentración de partículas fágicas (título) presentes en los lisados obtenidos durante las propagaciones, así como en todas las experiencias donde se cuantifiquen las mismas, se determinó por la técnica de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991).

## **5- Caracterización de los bacteriofagos**

### **5.1- Microscopía electrónica**

Las micrografías de los fagos autóctonos se obtuvieron en la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias (INTA-Castelar). Para obtener las micrografías se partió de suspensiones fágicas que fueron 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).

### **5.2- Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación**

#### **5.2.1- Viabilidad a 4 °C**

Se realizó un seguimiento de la viabilidad de los fagos a 4 °C, a través de la realización de títulos (usando la técnica de la doble capa agarizada) durante un período de aproximadamente 18 meses.

#### **5.2.2- Viabilidad a –20 °C y –80 °C**

Se realizaron títulos (por el método de la doble capa agarizada) de los stocks de los fagos estudiados que fueron conservados a –20 °C y –80 °C, abarcando un período aproximado de 18 meses.

### **5.3- Viabilidad a distintos pHs**

Para realizar este ensayo, se utilizó caldo MRS-Ca, cuyo pH fue ajustado entre 3 y 8 (pH 3, 4, 5, 6, 7 y 8). Una alícuota de las suspensiones fágicas a investigar se pusieron en contacto con el caldo a los distintos pH durante 30 min. En paralelo, se realizó un control, donde el pH del medio no fue modificado (pH= 6,4 ± 0,1) Luego de este tiempo, se realizó la titulación de las suspensiones mediante la técnica de la doble capa agarizada.

#### **5.4- Ciclos de Multiplicación Fágica (Burst Size)**

Se preparó un cultivo de la cepa sensible, incubándola a 42 °C en caldo MRS, hasta una turbidez adecuada ( $D.O._{\lambda 560}=0,5$ ). Dicho cultivo se centrifugó y el pellet se resuspendió en caldo MRS-Ca (1/5 del volumen inicial). Luego, 1 ml de esta suspensión bacteriana, se infectó con el fago (m.o.i.  $\approx 2$ ) y se incubó a 42 °C durante 30 min, de forma tal de permitir una adsorción superior al 90% de las partículas fágicas. Luego, esta mezcla se centrifugó (10.000 x g, 5 min), el pellet se resuspendió nuevamente en 10 ml de caldo MRS-Ca, y a partir de esta suspensión se efectuaron diluciones decimales. Estas diluciones se hacen para evitar la readsorción de las partículas liberadas, que induciría a error en la determinación del burst size. Los tubos fueron incubados a 42 °C en baño de agua termostatzado, y a intervalos regulares de tiempo, se extrajeron alícuotas (100  $\mu$ l) que fueron tituladas inmediatamente sobre la cepa sensible, para conocer el número de partículas fágicas libres.

Los resultados se expresaron en UFP 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 infección. Durante este período (llamado "fase de latencia"), el número de UFP/ml correspondió al número de infecciones productivas obtenidas después de la adsorción (Birge, 1994).

### **6- Resistencia térmica y química de los fagos**

#### **6.1- Cinéticas de muerte térmica**

Se llevaron a cabo estudios de inactivación térmica de los fagos, en tres medios de suspensión diferentes: caldo MRS, LDR y buffer TMG (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y gelatina 0,1% m/v). 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 °C, 72 °C 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 (caldo MRS, LDR y buffer TMG), de tal manera de obtener una concentración inicial de, aproximadamente  $10^6$  UFP/ml, distribuyéndose 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 las curvas de inactivación térmica a cada una de las temperaturas ensayadas, en los tres medios de suspensión. A partir de dichas curvas de supervivencia se determinó, para cada condición, el tiempo necesario para inactivar el 99% de las partículas fágicas ( $T_{99}$ ).

Con respecto a las cinéticas de inactivación, se puede realizar el siguiente análisis:

Si cada virus se inactiva en forma exponencial (reacción de primer orden), la relación entre las concentraciones de partículas viables ( $N_A$ ,  $N_B$ ) y tiempo ( $t$ ) es:

$$dN_A/dt = - k_1 N_A \quad (1)$$

$$dN_B/dt = - k_2 N_B \quad (2)$$

donde  $k_i$  son constantes de proporcionalidad y  $dN_i / dt$  representan las variaciones de las concentraciones con respecto al tiempo.

Integrando la ecuaciones 1 y 2 :

$$N_A = N_A^0 \exp (-k_1 t) \quad (3)$$

$$N_B = N_B^0 \exp (-k_2 t) \quad (4)$$

donde  $N_i^0$  son las concentraciones al comienzo del tratamiento térmico, y  $N_i$  las concentraciones al finalizar el tiempo  $t$ .

Por lo tanto, las partículas que sobrevivieron al tratamiento luego del tiempo  $t$  pueden representarse como:

$$N = N_A + N_B \quad (5)$$

$$N = N_A^0 \exp (-k_1 t) + N_B^0 \exp (-k_2 t) \quad (6)$$

La concentración inicial de partículas virales se expresa como:

$$N^0 = N_A^0 + N_B^0 \quad (7)$$

$$1 = N_A^0 / N^0 + N_B^0 / N^0 \quad (8)$$

y definiendo:  $\gamma = N_B^0 / N^0$  (9) y  $(1 - \gamma) = N_A^0 / N^0$  (10) la relación para la mezcla de partículas viables y no viables queda como:

$$N / N^0 = (1 - \gamma) \exp (-k_1 t) + \gamma \exp (-k_2 t) \quad (11)$$

donde la fracción  $(1 - \gamma)$  de la mezcla es inactivada según la constante  $k_1$ , y la fracción  $\gamma$  es inactivada según la constante  $k_2$ . En consecuencia, la curva de supervivencia es la suma de los dos componentes lineales, los cuales se interceptan en  $(1 - \gamma)$  y  $\gamma$ , respectivamente. De acuerdo a esto, se construyeron las curvas de tratamiento subletal (63°C).

## **6.2- Cinéticas de muerte química**

Los biocidas fueron elegidos entre aquellos 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 (desde 100 hasta 1400 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 2,3). Se inocularon las partículas fágicas (concentración inicial,  $10^6$  UFP/ml aproximadamente) e incubaron a las temperaturas fijadas. Para determinar la eventual influencia del pH en la viabilidad fágica, se suspendieron las partículas virales en caldo MRS, previo ajuste del pH (de modo de simular las condiciones de pH resultantes de diluir los biocidas en sus correspondientes medios de suspensión), sin la adición de ningún biocida (control). A intervalos de tiempo preseleccionados, se tomaron alícuotas de las diluciones (100  $\mu$ l), titulándolas de inmediato, para determinar la concentración de bacteriofagos viables.

## **7- Caracterización molecular de los fagos**

Estos estudios se llevaron a cabo en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (I.P.L.A., España), con la gentil colaboración del Dr. Miguel Alvarez y la Dra. Ana Binetti.

### **7.1- Extracción de ADN fágico**

Se inocularon 50 ml de caldo MRS adicionado de  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) con la cepa sensible (2%), y con el fago, a una dosis infectiva adecuada para que la lisis total se

produjera aproximadamente a las 4-6 hs de incubación a 42 °C (m.o.i. aprox. de  $10^{-1}$ -  $10^{-2}$ ). Cuando se observó la lisis completa del cultivo, se centrifugo a 10.000 rpm durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se le añadió 10 ml de PEG-NaCl (20% PEG 6000; 2,5 M NaCl), y se precipitó a 4 °C durante toda la noche. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se dio un pulso en la centrifuga para que no queden restos del medio. El pellet se resuspendió en 0,4 ml de tampón SM (Anexo) adicionado de RNAsa (40 µg/ ml). Se incubó a 37 °C durante 30 min. Se añadieron 80 µl de la mezcla de lisis (Anexo). Se incubó a 65 °C durante 30 min. Se añadieron 100 µl de acetato de potasio (8 M), incubándose en hielo durante 15 min. Se centrifugo a 13.200 rpm durante 15 min a 4 °C. Se adicionó un volumen igual de isopropanol, dejando reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugo nuevamente durante 5 min, desechándose el sobrenadante. Se resuspendió en 630 µl de buffer TE (Anexo). Una vez resuspendido, se agregaron 70 µl de acetato de sodio (3 M) y 700 µl de isopropanol, dejando en reposo a temperatura ambiente durante 5 min. Esta operación (desde el agregado de buffer TE), se repitió una vez más. Luego se recuperó el ADN por centrifugación (10 min, 13.000 rpm), y se lavó con 1 ml de etanol absoluto (3 veces) y 1 ml de etanol 70% durante 1 min. Se resuspendió el ADN fágico en buffer TE, y se conservó a -20 °C.

## **7.2- Perfiles de restricción**

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN fágico fue tratado con las enzimas *Bgl*II, *Hind*III, *Eco*RV, *Sa*I y *Xho*I. La separación de los fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v), de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989). El tamaño de los genomas fágicos se estimó sumando los fragmentos obtenidos con cada una de las enzimas.

## **7.3- Sitios de empaquetamiento (*cos*-, *pac*- sites)**

Una alícuota de ADN fágico purificado se sometió a ligación (1 h, 16 °C), utilizando el kit Ready-to-go T4 DNA Ligasa (Amersham Pharmacia, England), luego se inactivó la ligasa durante 15 min a 65 °C. El ADN así tratado se denominó ADN ligado.

Una porción de ADN fágico ligado y otra de ADN fágico sin ligar fueron sometidas a digestiones con endonucleasas de restricción, de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Los genomas fágicos fueron tratados con *HindIII* y *BglII*.

Luego de las digestiones, los fragmentos de restricción fueron sometidos a tratamiento térmico (70 °C durante 10 min) (en el caso del ADN ligado, como los extremos cohesivos se unen covalentemente, no son afectados por el calentamiento, en cambio en el caso del ADN no ligado, los extremos cohesivos se separan). La mezcla de fragmentos fue separada mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v).

## **8- Interacción de *Lactobacillus delbrueckii* con sus fagos específicos**

### **8.1- Efecto del ion calcio sobre la lisis en medio líquido**

Cultivos incubados durante 16-18 hs de las cepas fueron inoculados en caldo, con y sin CaCl<sub>2</sub> (10 mM) (Luccini y col., 1999). Cada uno de ellos fue infectado con su fago lítico (m.o.i.  $\cong$  0,5). Luego de una agitación suave, se incubó a 42 °C junto con un control de la cepa bacteriana sin infectar con el fago, en el mismo medio de cultivo. Se examinaron los tubos en forma periódica, agitando suavemente y controlando la existencia o no de lisis (disminución o no de la turbidez). En el caso de no registrarse lisis de los cultivos, se realizaron otros dos repiques en caldo de cultivo fresco, antes de concluir en la necesidad o independencia del ion Ca<sup>2+</sup> para completar la lisis en medio líquido.

### **8.2- Influencia del ion calcio en la formación de placas de lisis en medio agarizado**

Este ensayo se realizó por el método de la doble capa agarizada, y se utilizaron dos placas; en una de ellas, se utilizó agar MRS y en otra agar MRS-Ca.



### **8.3- Adsorción**

La cepa bacteriana en estudio fue desarrollada en caldo MRS a 42 °C hasta alcanzar la fase exponencial temprana ( $A_{\lambda,560} = 0,4- 0,5$ ), cosechándose luego las células por centrifugación (10 min, 4.500 x g). Se separó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en caldo fresco, en la mitad del volumen original. Cada cultivo se infectó con su fago específico (m.o.i.= 0,02) en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. Se realizó una incubación a 42 °C en baño de agua termostaticado, y a diferentes intervalos de tiempo se retiraron los tubos, y se los colocó en baño de hielo (para frenar la adsorción) y se centrifugaron (5 min, 12.000 x g), con el objetivo de separar las células que poseen fagos adsorbidos de los fagos libres. Se extrajeron alícuotas (100  $\mu$ l) de los sobrenadantes y se titularon sobre la cepa sensible (método de la doble capa agarizada) para conocer la concentración de fagos libres.

El porcentaje de fagos adsorbidos fue calculado como:

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

Donde  $T_i$  es el título inicial de fagos (UFP/ ml), puestos en contacto con la cepa, y  $T_f$  los fagos remanentes en el sobrenadante (fagos no adsorbidos).

Las cinéticas de adsorción fueron obtenidas graficando el porcentaje (%) de adsorción en función del tiempo.

### **8.4- Caracterización de la Adsorción**

#### **8.4.1- 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  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) y a la otra no.

Las curvas de adsorción fueron trazadas en función del tiempo, para ambas condiciones (con y sin  $\text{Ca}^{2+}$ ), como se indicó en 7.3.

#### **8.4.2- Influencia de la Temperatura**

Para estudiar la influencia de la temperatura de incubación sobre la adsorción de los fagos a las cepas bacterianas sensibles (Watanabe y col., 1993; Quiberoni, 1997), se utilizó la técnica de adsorción ya descrita, agregando  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) al medio, y respetando las demás condiciones de reacción.

Se estableció un tiempo de adsorción de 30 min, realizando el estudio a las temperaturas de 0, 10, 20, 37, 42 y 50 °C. Luego se centrifugaron los tubos Eppendorf de igual manera que en la técnica de adsorción, a fin de separar las partículas no adsorbidas, las que fueron tituladas por el método de la doble capa agarizada.

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

#### **8.4.3- Influencia del Estado Fisiológico Celular**

Se analizó la dependencia de la adsorción con el estado fisiológico de las células, según Watanabe y col. (1993, 1995). Para ello, se utilizó un cultivo de las mismas características que el empleado para el ensayo de adsorción, que luego de ser centrifugado y resuspendido tal como ya fue descrito (sección 7.3), fue sometido a un tratamiento térmico, para producir la muerte de todas las células. Este tratamiento consistió en sumergir la suspensión celular en un baño de agua hirviendo, durante 10 min.

La efectividad del tratamiento térmico fue monitoreada mediante el cultivo en medio líquido (caldo) y en medio agarizado de las células tratadas. Para aceptar un cultivo como no viable, se impuso el criterio de que no se desarrollara en medio líquido, y que existiera, al menos, una reducción del 99% en las UFC en medio agarizado, con respecto al recuento original del cultivo control (células sin tratar).

Con el cultivo que fue sometido al tratamiento térmico, se realizó un ensayo de adsorción típico, en paralelo con células sin tratar (control), incubándose a 42 °C durante 5, 15, 30 y 45 min.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de fagos adsorbidos, respecto del número inicial de fagos puestos en contacto con las células bacterianas viables y no viables, en función del tiempo.

La viabilidad en medio líquido se controló inoculando (1%) en caldo, las suspensiones celulares bacterianas sometidas o no al tratamiento térmico, e incubando a 42 °C, luego de lo cual se observó la presencia o no de turbidez debida al desarrollo de las células bacterianas.

La viabilidad en medio agarizado se determinó realizando sendos recuentos a los cultivos bacterianos con y sin tratamiento térmico. Para ello se sembraron en superficie (agar MRS) sucesivas diluciones decimales. Las placas fueron incubadas durante 48 hs a 42 °C en microaerofilia, comparándose los recuentos obtenidos.

## **8.5- Ensayos de adsorción sobre paredes celulares**

### **8.5.1- Preparación de las paredes celulares**

La obtención de las 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 (2%) 1 litro de caldo. Se incubó a 42 °C, hasta alcanzar una  $D.O_{\lambda, \text{máx}=560} = 0,5-0,8$ . Se recolectaron las células por centrifugación a 2.000 x g por 5 min. Luego de separar el sobrenadante, se lavó el pellet en 1/5 del volumen inicial con buffer fosfato (10 mM, pH 6,8 a 4 °C) dos veces, centrifugando luego de cada lavado 10-15 min a 2.000 x g (Callegari, 1992). Se resuspendieron las células en buffer fosfato (1/10 del volumen inicial) y se colocaron en tubos FALCON (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; Sigma) 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 se realizó una observación directa al microscopio óptico. Este recuento, así como los siguientes, fueron realizados por

una microtécnica (detallada al final de la 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 2 hs, enfriando en baño de hielo (0 °C) cada 30 seg.

La efectividad de la rotura fue seguida por microscopía óptica (contraste de fases, 1000 x) y confirmada por micro-recuento en placa (recuento final).

Las perlas de vidrio fueron separadas del sobrenadante por sedimentación, y fueron dejadas en reposo durante 2 hs a 0-4 °C (Callegari, 1992). 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. Todos los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados.

Las perlas de vidrio fueron recicladas según se describe en el ANEXO (Ranhand,1974).

Las células enteras y demás detritus celulares fueron separados de las paredes por centrifugación a 3.500 x *g*, durante 10 min. El pellet fue descartado, y el sobrenadante conteniendo las paredes celulares fue centrifugado a 11.900 x *g* durante 15 min (4 °C), con el objetivo de concentrar las paredes crudas en un pellet.

Sobre las paredes crudas se realizó 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 1 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), adicionándole DNAsa (0,10 mg/ml) y RNAsa (0,15 mg/ml), se incubó 30 min en baño de agua a 37 °C y se centrifugaron los tubos a 11.900 x *g* durante 15 min (4 °C), descartándose el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado 5 veces con buffer fosfato (10 mM, pH 6,8), centrifugando a 11.900 x *g*, descartando el sobrenadante luego de cada lavado. El objetivo fue eliminar los restos de citoplasma y enzimas contenidas en las paredes. Callegari (1992) observó por microscopía electrónica que la célula bacteriana al romperse por el uso de

perlas de vidrio, se fractura en uno o dos puntos, a lo sumo. Por lo tanto resulta crítico el número de lavados, que en caso de reducirse, dejan restos que pueden interferir en los posteriores ensayos a los cuales se sometan las paredes. Una vez finalizado este tratamiento, se obtuvieron las paredes puras, que luego de ser concentradas por centrifugación a  $11.900 \times g$  durante 15 min, se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Stiefel, 2000).

Microtécnica de recuento bacteriano en placa: Se tomaron  $100\ \mu\text{l}$  de agua de peptona (0,1%) o caldo de cultivo. Sobre una placa de Petri dividida en cuartos, se preparó una base de agar MRS. Sobre cada cuarto de placa, se volcó una mezcla de  $100\ \mu\text{l}$  de la dilución de las células, 1 ml de soft agar MRS y  $\text{CaCl}_2$  10 mM.

Se incubó a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 hs, con el objetivo de permitir un buen desarrollo de las colonias; teniendo en cuenta la dilución efectuada al realizar el recuento de las UFP/ml.

### **8.5.2- Tratamientos selectivos sobre paredes celulares**

En primera instancia, se realizó una calibración de las paredes para conocer la cantidad a utilizar, de tal manera que se cumpliera con la condición de adsorber al menos el 90% de las partículas fágicas, cuando se trabaja con una concentración aproximada entre  $10^5$  y  $10^6$  UFP/ml de éstas (Valyasevi y col., 1990; Callegari, 1992).

Conocido dicho parámetro, se resuspendió el stock almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en buffer Tris-HCl (50 mM, pH= 7,5), y se tomó la cantidad adecuada, repartiéndose alícuotas iguales en 5 tubos Eppendorf, en los cuales se realizaron los siguientes tratamientos:

× **Mutanolisina (50 U/ml)**: 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se inactivó la enzima colocando los tubos a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 min, y enfriando rápidamente en baño de hielo.

× **Proteinasa K (0,1 mg/ml)**: 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sumergiendo luego en baño de hielo para detener la reacción.

× **SDS (1%)**: 30 min a 37 °C. Al igual que en el caso anterior, 30 min a 37 °C, sumergiendo luego en baño de hielo para detener la reacción.

× **Acido tricloroacético (TCA, 5%)**: 15 min a 90 °C, sumergiendo en baño de hielo para detener la reacción.

× **Control de adsorción**: paredes celulares resuspendidas en buffer Tris-HCl, 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, tanto las paredes tratadas como las paredes del control fueron lavadas 10 veces con buffer fosfato (10 mM, pH= 6,8), centrifugando a 11.900 x g y descartando el sobrenadante luego de cada lavado. Así se completó la preparación de las paredes para ser usadas en los ensayos de adsorción.

### **8.5.3- Ensayos de adsorción sobre las paredes tratadas**

Se resuspendieron las paredes tratadas en 0,9 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH= 7,5) de tal manera de poder adsorber al menos 90% de las partículas fágicas.

Se adicionó CaCl<sub>2</sub> (10 mM) y 0,1 ml de una dilución del fago, para que la concentración en el medio de reacción sea de 10<sup>6</sup> UFP/ml. Se incubó 30 min a 42 °C en baño de agua, y luego de este tiempo se centrifugó 10 min a 11.900 x 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:

$$\%Ads = \frac{Ti - Tf}{Ti} \times 100$$

Donde Ti es el título inicial de fagos (UFP/ml) puestos en contacto con las paredes de la cepa sensible, y Tf, los fagos remanentes en el sobrenadante (fagos no adsorbidos a las paredes).

#### **8.5.4- Reversibilidad en la unión de los fagos adsorbidos a paredes celulares purificadas**

Luego de titular las UFP/ml remanentes en el control (paredes limpias) del ensayo de adsorción (sección 7.5.3), se descartó el sobrenadante, el cual contenía los fagos no adsorbidos. El pellet libre del sobrenadante, que contenía las paredes con las partículas fágicas adsorbidas, se resuspendió en 1 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH= 7,5). A distintos intervalos de tiempo se titularon las UFP/ml libres. De esta manera, se obtuvo una primera aproximación del grado de reversibilidad de la unión fago-receptor de pared (Valyasevi y col., 1990; Callegari, 1992).

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.

#### **9- Ensayos de neutralización de fagos con monosacáridos**

Se ensayaron los siguientes monosacáridos: Glucosa, Galactosa, Manosa, Ramnosa, Ribosa, Glucosamina y N-Acetilglucosamina.

A 0,9 ml de una solución del monosacárido a testear, usando como diluyentes Tris-HCl (50 mM, pH= 7,5) o agua bidestilada estéril (CaCl<sub>2</sub> 10 mM) (Valyasevi y col., 1990), se adicionó 0,1 ml de una suspensión fágica conteniendo 10<sup>6</sup> UFP/ml. La concentración de monosacáridos utilizada fue de 500 mM. Luego de 30 min de incubación a 42 °C, se tituló 0,1 ml del tubo de reacción 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 (Ti), y el número de UFP/ml remanente (luego de los 30 min de incubación, Tf)

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

# RESULTADOS

---



## 1. Aislamiento de los fagos

### 1.1- Pruebas preliminares

De la caracterización inicial de las muestras analizadas se obtuvo la siguiente información:

**Muestra M1:** presentó un pH 4,61, y al microscopio óptico se observaron sólo bacilos en escasa proporción.

**Muestra M2:** se midió un pH 4,35, y se observó una pequeña cantidad de cocos y bacilos.

**Muestra M3:** presentó un pH 4,33 y al microscopio óptico se evidenció la presencia de cocos y bacilos, estando los primeros en una mayor proporción.

A partir de pruebas positivas (Test de actividad, Test de turbidez y Spot test) para la detección de bacteriofagos, se procedió al aislamiento de los fagos presentes en las tres muestras, como se detalla más adelante.

### 1.2- Aislamiento de las diferentes cepas del fermento

A partir de una siembra superficial del fermento FY en agar MRS, se aislaron 7 clones de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, denominados Ab<sub>1</sub>, Ab<sub>2</sub>, Ab<sub>3</sub>, Ab<sub>4</sub>, Ab<sub>5</sub>, Ab<sub>6</sub> y Ab<sub>7</sub>.

Por otro lado, a partir de una siembra en superficie del fermento FI en agar MRS, se aislaron 5 clones denominados Ib<sub>1</sub>, Ib<sub>2</sub>, Ib<sub>3</sub>, Ib<sub>4</sub> e Ib<sub>5</sub> pertenecientes a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

### 1.3- Caracterización del agente responsable del retardo en la acidificación

Los ensayos de turbidez efectuados sobre los clones del fermento FY, con los filtrados libres de células provenientes de muestras con y sin tratamiento térmico,

permitieron identificar clones fago-resistentes ( $Ab_2$ ,  $Ab_4$ ,  $Ab_5$  y  $Ab_6$ ) y fago-sensibles ( $Ab_1$ ,  $Ab_3$  y  $Ab_7$ ).

Con respecto al fermento FI, se realizaron los mismos ensayos que en el caso anterior, y de aquí pudieron aislarse clones fago-resistentes ( $lb_1$  e  $lb_4$ ), y otros fago-sensibles ( $lb_2$ ,  $lb_3$  e  $lb_5$ ).

#### 1.4- Aislamiento de los fagos

Se seleccionó el clon  $Ab_1$  de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (fermento FY) para efectuar el aislamiento de los fagos líticos contenidos en la muestra M1.

Al realizarse los recuentos de partículas fágicas sobre la muestra de yogur, se obtuvo un título del fago de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de  $2 \cdot 10^2$  UFP/ml. La morfología de las placas de lisis resultó ser uniforme, por lo que se asumió que en el filtrado existía sólo un fago de esta especie. Al fago lítico del clon  **$Ab_1$**  se lo denominó **YAB**. La morfología de las placas de lisis se mantuvo constante durante todas las etapas siguientes de aislamiento y purificación.

En el ensayo de la doble capa agarizada en agar MRS sobre el clon  $Ab_1$ , el fago YAB formó placas de lisis de un tamaño aproximado de 1,5 a 2 mm de diámetro.

Por otro lado, se eligió el clon  $lb_3$  de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (fermento FI) para realizar el aislamiento de los fagos líticos presentes en las muestras M2 y M3. Los títulos de fagos en las muestras fueron de  $2,9 \cdot 10^3$  UFP/ml en el primer aislamiento, mientras que en el segundo aislamiento, el título fue de  $1 \cdot 10^2$  UFP/ml. En ambos aislamientos, la morfología de las placas de lisis resultó ser uniforme y similar en los dos casos, siendo estas placas muy nítidas, y también se mantuvo constante durante todas las etapas sucesivas de aislamiento y purificación, tanto a partir de la muestra M2 como de la M3. A partir de estas dos muestras (M2 y M3) se aisló un mismo fago. A este fago, lítico del clon  **$lb_3$** , se lo denominó, asimismo,  **$lb_3$** .

---

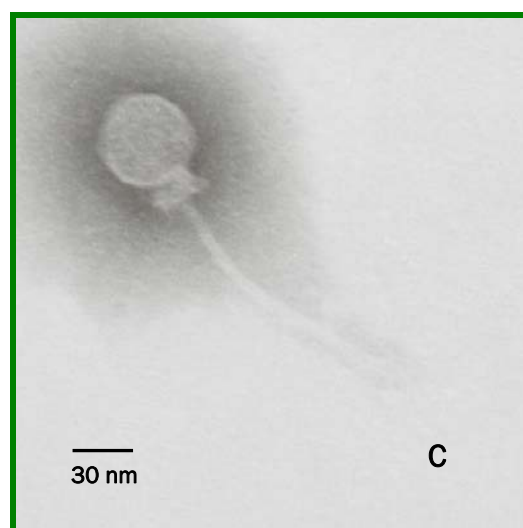
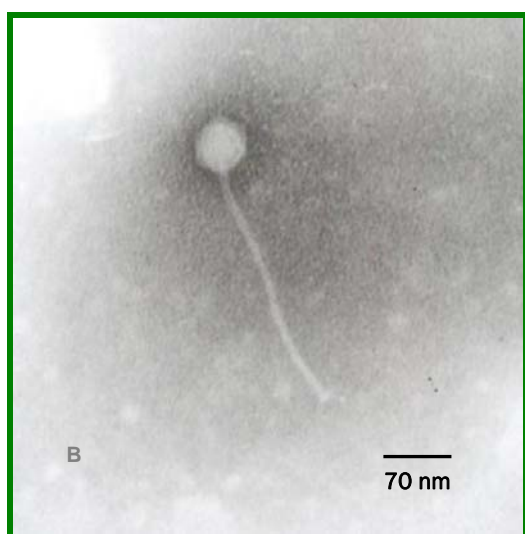
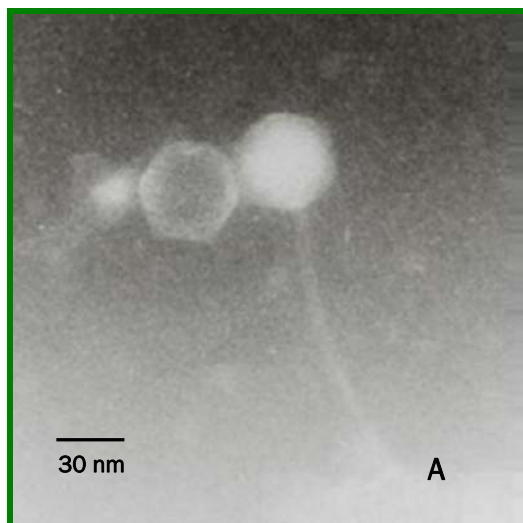
## 2. Caracterización de los fagos

### 2.1- Microscopía electrónica

✗ **Fago YAB:** posee una cabeza isométrica de  $57,5 \pm 1,3$  nm de diámetro, y una cola de  $251,0 \pm 5,3$  nm de longitud y  $7,0 \pm 0,5$  nm de diámetro (Fig. 10-A).

✗ **Fago Ib<sub>3</sub>:** presenta una cabeza isométrica de  $54,0 \pm 2,4$  nm de diámetro, y una cola de  $272,0 \pm 4,0$  nm de longitud y  $9,0 \pm 0,2$  nm de diámetro (Fig. 10-B).

✗ **Fago BYM:** presenta una cabeza isométrica de  $50,0 \pm 1,6$  nm de diámetro y una cola de aproximadamente  $181,0 \pm 2,0$  nm de largo y  $5,9 \pm 0,2$  nm de diámetro. Este fago presenta la particularidad de poseer una estructura de collar, la cual es bastante frecuente en fagos infectivos del género *Lactobacillus* (Fig. 10-C).



**Fig. 10:** Micrografías electrónicas de los fagos YAB (A), Ib<sub>3</sub> (B) y BYM (C).

---

## 2.2- Viabilidad de los bacteriofagos durante la conservación

### 2.2.1- Viabilidad a temperatura de refrigeración (4 °C)

Al realizar el seguimiento de la viabilidad del fago autóctono YAB, se observó una caída en más de dos órdenes logarítmicos en el título obtenido a lo largo de 18 meses (de  $1.10^8$  a  $6.10^5$  UFP/ ml). Similar disminución se observó en el número de partículas viables del fago BYM (de  $1.10^8$  a  $5.10^6$  UFP/ ml), pero en este caso el seguimiento se realizó durante un tiempo inferior, que fue de 14 meses. En el caso del fago Ib<sub>3</sub>, la reducción observada durante un período de 18 meses fue de tres órdenes logarítmicos (de  $1.10^9$  a  $1.10^6$  UFP/ ml).

Con respecto a los fagos de colección estudiados, se observó una menor disminución en el número de partículas viables durante los 18 meses, al compararlos con los fagos autóctonos analizados. En el caso del fago de colección LL-H, esta disminución fue de sólo un orden (de  $6.10^8$  a  $7.10^7$  UFP/ ml), y de menos de dos órdenes logarítmicos para el fago Ib539 (de  $1.10^8$  a  $8.10^6$  UFP/ ml).

### 2.2.2- Viabilidad a -20 °C y -80 °C

La viabilidad del fago autóctono Ib<sub>3</sub>, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ib<sub>3</sub> cayó en menos de dos órdenes (en un período de 18 meses), tanto a -20 °C como a -80 °C. En el caso del fago de colección LL-H, se observó una gran disminución en el número de partículas viables (de cuatro órdenes logarítmicos) a -20 °C, pero a diferencia de esto, se observó una caída de menos de un orden cuando se lo conservó a -80 °C. Algo similar se observó cuando se hizo el seguimiento del fago Ib539, donde la caída del título fue importante a -20 °C (cuatro órdenes) y mucho menor a -80 °C (dos órdenes).

## 2.3- Viabilidad fágica a distintos pH

La viabilidad a los distintos pH dependió en gran medida del sistema fago/ cepa sensible estudiado, pero en general, ésta fue muy baja a los pH extremos, siendo mínima a

pH 4 y un poco más elevada a pH 8. En el rango de pH comprendido entre 5 y 7 la viabilidad fue excelente para los fagos YAB y BYM (96 a 100% de partículas fágicas viables) luego de 30 min, mientras que para el fago  $Ib_3$  fue menor, disminuyendo a 57-62% de partículas fágicas viables. En el caso del fago de colección LL-H, se observó muy baja viabilidad a pH 3, 7 y 8; mientras que a pH 5 y 6 ésta fue aceptable (88%) (Fig. 11).

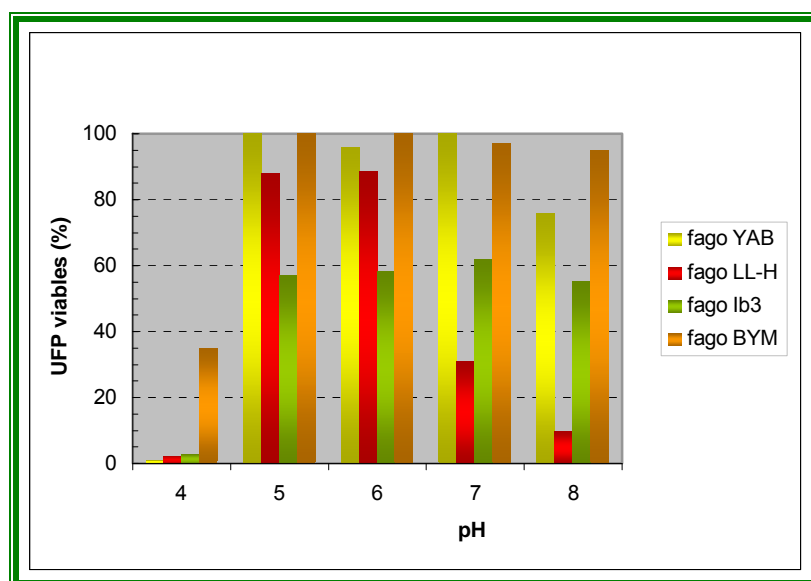


Fig. 11: Viabilidad de los fagos YAB, LL-H,  $Ib_3$  y BYM a distintos pH (luego de 30 min a 42 °C).

#### 2.4- Ciclos de multiplicación fágica (Burst size)

La Figura 12 muestra las cinéticas de multiplicación de los fagos estudiados, a partir de las cuales fueron calculados los parámetros característicos (Tabla 6).

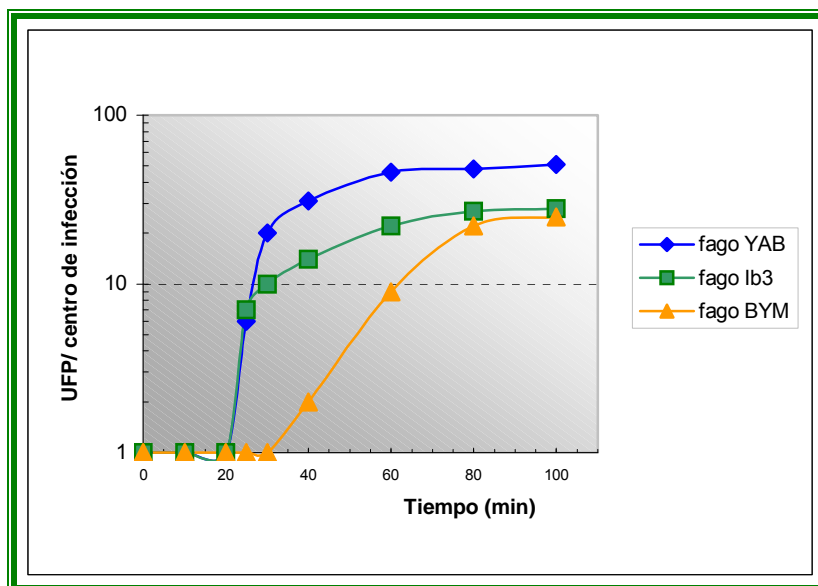


Fig. 12: Cinéticas de multiplicación (burst size) de los fagos YAB, Ib<sub>3</sub>, y BYM.

Tabla 6: Parámetros característicos de las cinéticas de multiplicación de los fagos estudiados (los valores representan el promedio de dos determinaciones).

Fago	Período de latencia (min)	Tiempo de Burst (min)	Burst Size (UFP/ centro de infección)
YAB	20	60	48
Ib <sub>3</sub>	20	80	27
BYM	40	80	23

## 2.5- Resistencia térmica y química de los fagos

### 2.5.1- Cinéticas de muerte térmica

Los fagos más resistentes al tratamiento a 63°C fueron los fagos BYM e Ib<sub>3</sub> (Figs. 13 y 15), los cuales exhibieron valores de T<sub>99</sub> mayores a 45 min en los tres medios de suspensión utilizados (Tabla 7). Se encontró una escasa resistencia térmica del fago LL-H a 63 °C (Fig. 16), el cual fue rápidamente inactivado (T<sub>99</sub> de 3,1 min) a esta temperatura en caldo MRS. El efecto del medio de suspensión incidió en la resistencia térmica de los fagos YAB (Fig. 14) y LL-H, ya que se observaron valores de T<sub>99</sub> elevados en LDR, mientras que se obtuvieron menores valores en caldo MRS.

Al realizar el tratamiento a 72 °C, se observó una rápida reducción del número de partículas fágicas viables (T<sub>99</sub> menor a 2,9 min) en los tres medios de suspensión utilizados (Figs. 17 a 20 y Tabla 7). Luego de la incubación en caldo MRS, buffer TMG y LDR, se observó una inactivación completa del fago Ib<sub>3</sub> a los 5, 30 y 45 min, respectivamente. La inactivación de las partículas fágicas se alcanzó (< 10 UFP/ml) (en los tres medios de suspensión), a tiempos muy diversos (desde 2,5 min en caldo MRS para el fago LL-H hasta 45 min en buffer TMG para el fago Ib<sub>3</sub>).

El tratamiento realizado a 90 °C durante 5 min fue suficiente para obtener recuentos menores a 10 UFP/ml en los tres medios de suspensión usados, para los fagos BYM, YAB y LL-H. Como en los casos anteriores, el fago Ib<sub>3</sub> mostró una mayor termo-resistencia, ya que su inactivación completa en LDR se obtuvo sólo luego de 15 min de tratamiento, aunque en buffer TMG y en caldo MRS fueron suficientes 5 min (datos no mostrados).



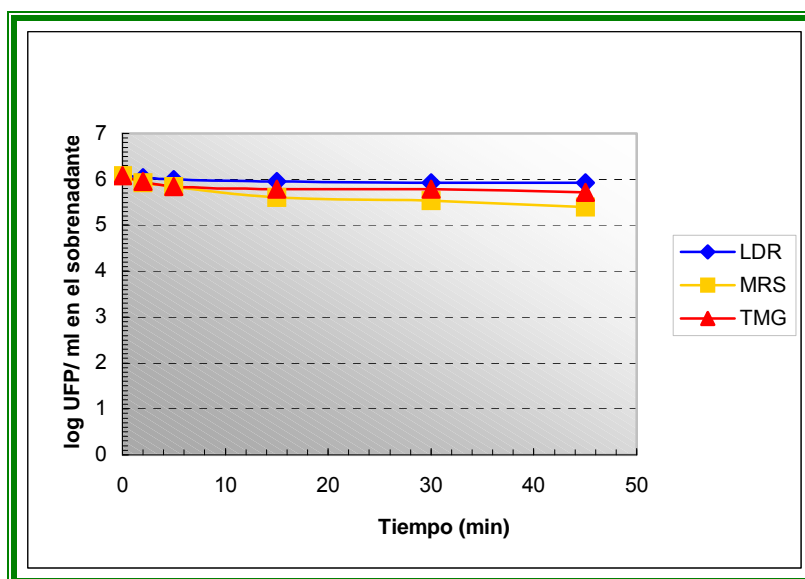


Fig. 13: Curvas de inactivación térmica a 63 °C para el fago **BYM** en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

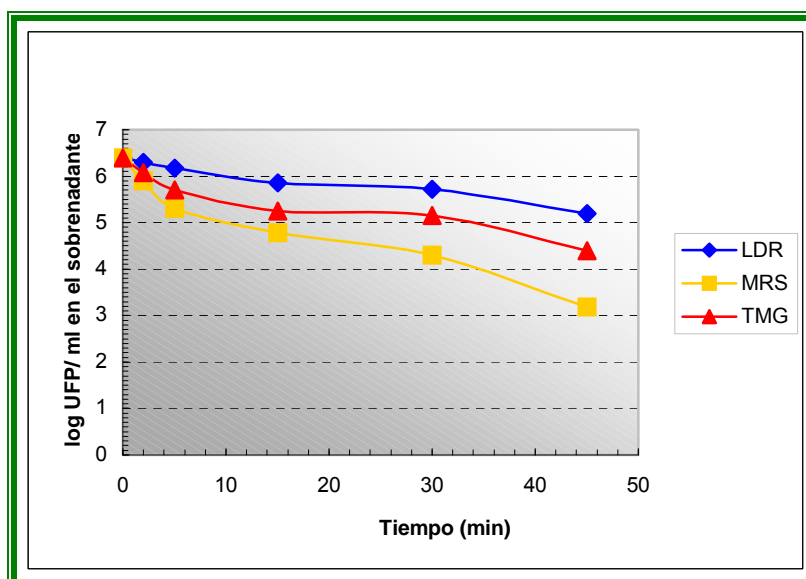


Fig. 14: Curvas de inactivación térmica a 63 °C para el fago **YAB** en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

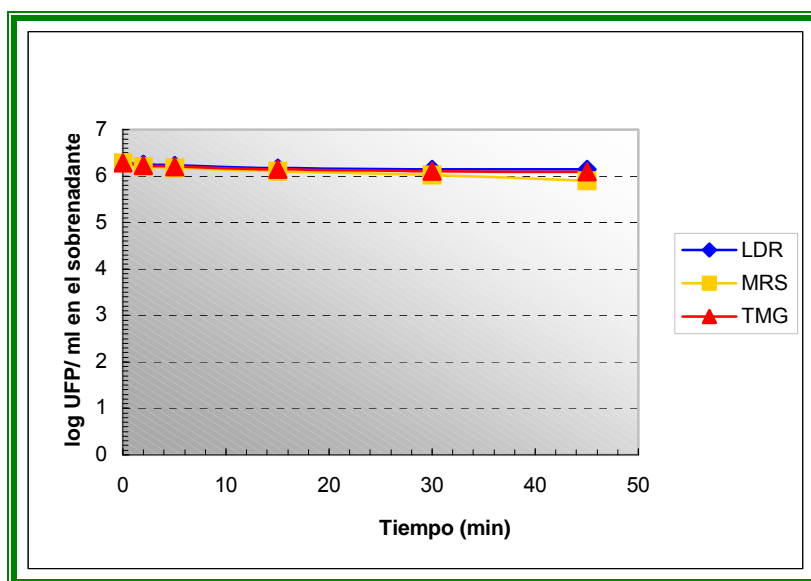


Fig. 15: Curvas de inactivación térmica a 63 °C para el fago *Ib3* en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

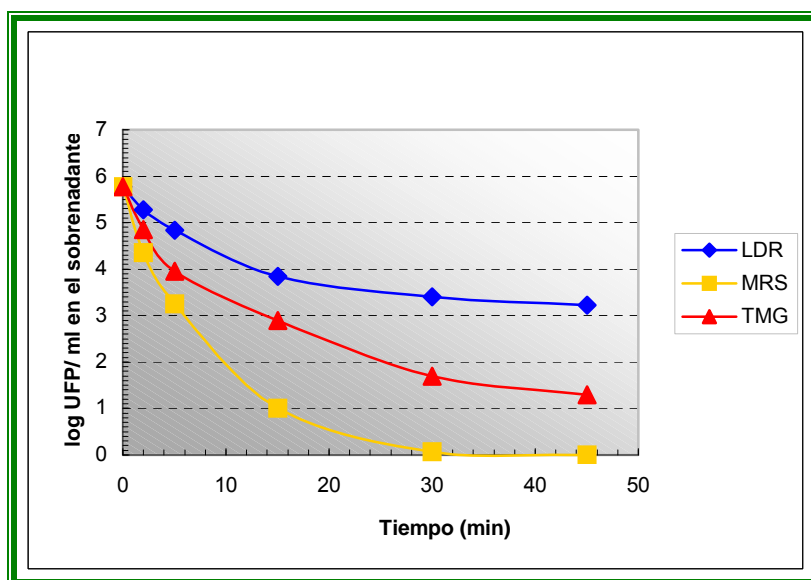


Fig. 16: Curvas de inactivación térmica a 63 °C para el fago *LL-H*, en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

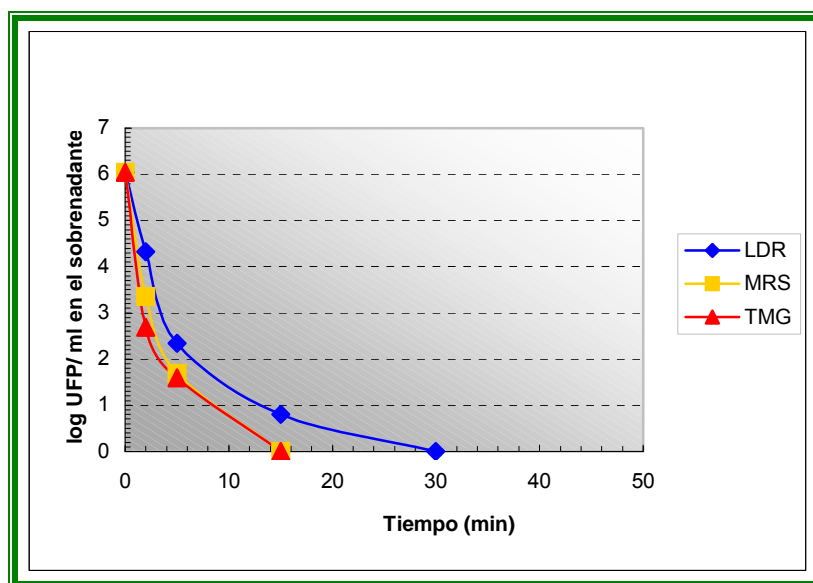


Fig. 17: Curvas de inactivación térmica a 72 °C para el fago **BYM** en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

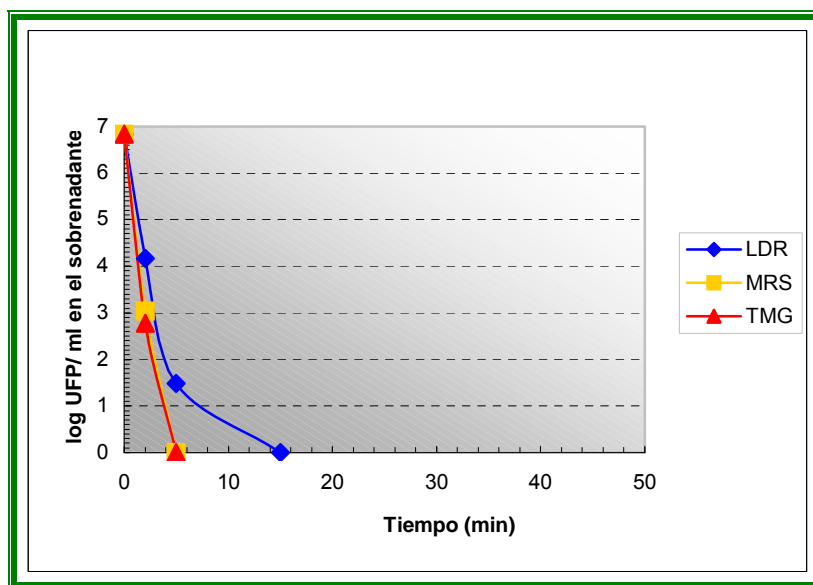


Fig. 18: Curvas de inactivación térmica a 72 °C para el fago **YAB** en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

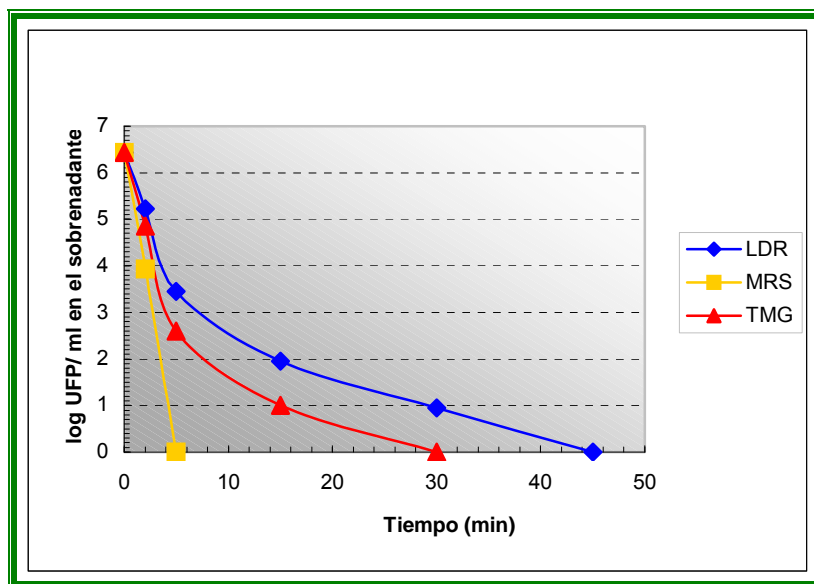


Fig. 19: Curvas de inactivación térmica a 72 °C para el fago  $Ib_3$  en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

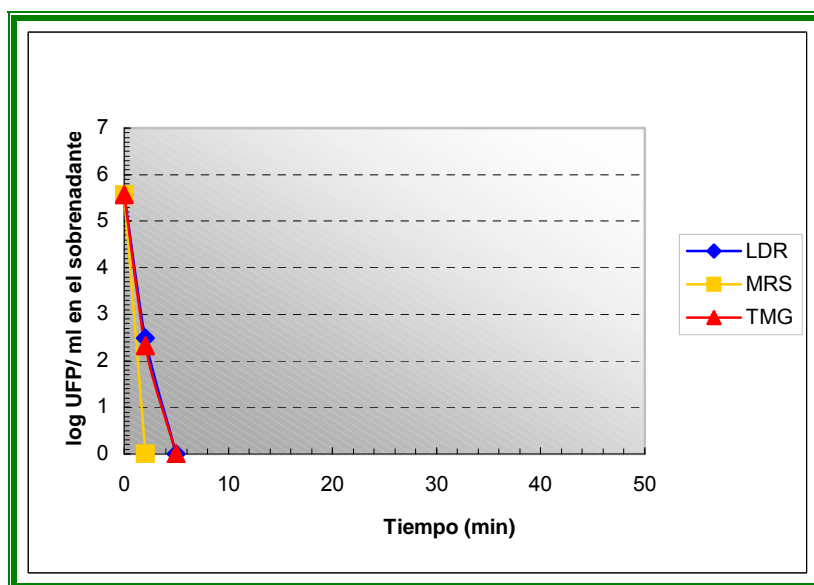


Fig. 20: Curvas de inactivación térmica a 72 °C para el fago LL-H en LDR, caldo MRS y buffer TMG.

**Tabla 7:** Resistencia térmica de fagos de *Lactobacillus delbrueckii* en diferentes medios de suspensión, expresada como tiempo (min) para lograr el 99% de inactivación de las partículas fágicas ( $T_{99}$ ) (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

Fago	$T_{99}$					
	Caldo MRS		Buffer TMG		LDR	
	63°C	72°C	63°C	72°C	63°C	72°C
<b>BYM</b>	>45	<2,0	>45	<2,0	>45	2,3
<b>YAB</b>	27,9	<2,0	45,0	<2,0	>45	<2,0
<b>lb<sub>3</sub></b>	>45	2,5	>45	<2,0	>45	2,9
<b>LL-H</b>	3,1	<2,0	6,2	<2,0	15,8	<2,0

De acuerdo al modelo cinético descrito con anterioridad (Materiales y Métodos), se construyeron las curvas teóricas de tratamiento térmico subletal (63 °C). Estas curvas (Fig. 21) tuvieron una buena correlación con los datos experimentales. Fue posible obtener la fracción  $(1 - \gamma)$  de la población de partículas fágicas inactivadas según la constante  $k_1$  para cada fago estudiado, así como la fracción  $\gamma$  inactivada según el valor de la constante  $k_2$  (Tabla 8). El análisis de los parámetros obtenidos confirma nuestros resultados experimentales, considerando la influencia de los medios de suspensión, ya que las constantes  $k_1$  y  $k_2$  obtenidas en LDR fueron siempre las más pequeñas para todos los fagos, lo que indica una menor velocidad de inactivación en este medio. La mayor termo-resistencia del fago lb<sub>3</sub>, también pudo ser deducida mediante la comparación de estos parámetros, ya que los valores de  $\gamma$  fueron los más elevados, lo que sugiere una gran proporción de partículas viables o termorresistentes. A diferencia de esto, se encontraron los valores más pequeños de  $\gamma$  para el fago LL-H. Por otro lado, mediante el análisis de los

valores de  $\gamma$  de los diferentes fagos se pudo deducir el efecto protector que ejerce el medio LDR. Los valores de  $\gamma$  fueron notablemente elevados en este medio para los fagos BYM, YAB y LL-H. Se observó una escasa influencia de este medio en el caso del fago Ib<sub>3</sub>, ya que sus valores de  $\gamma$  fueron similares a los obtenidos en los demás medios utilizados.

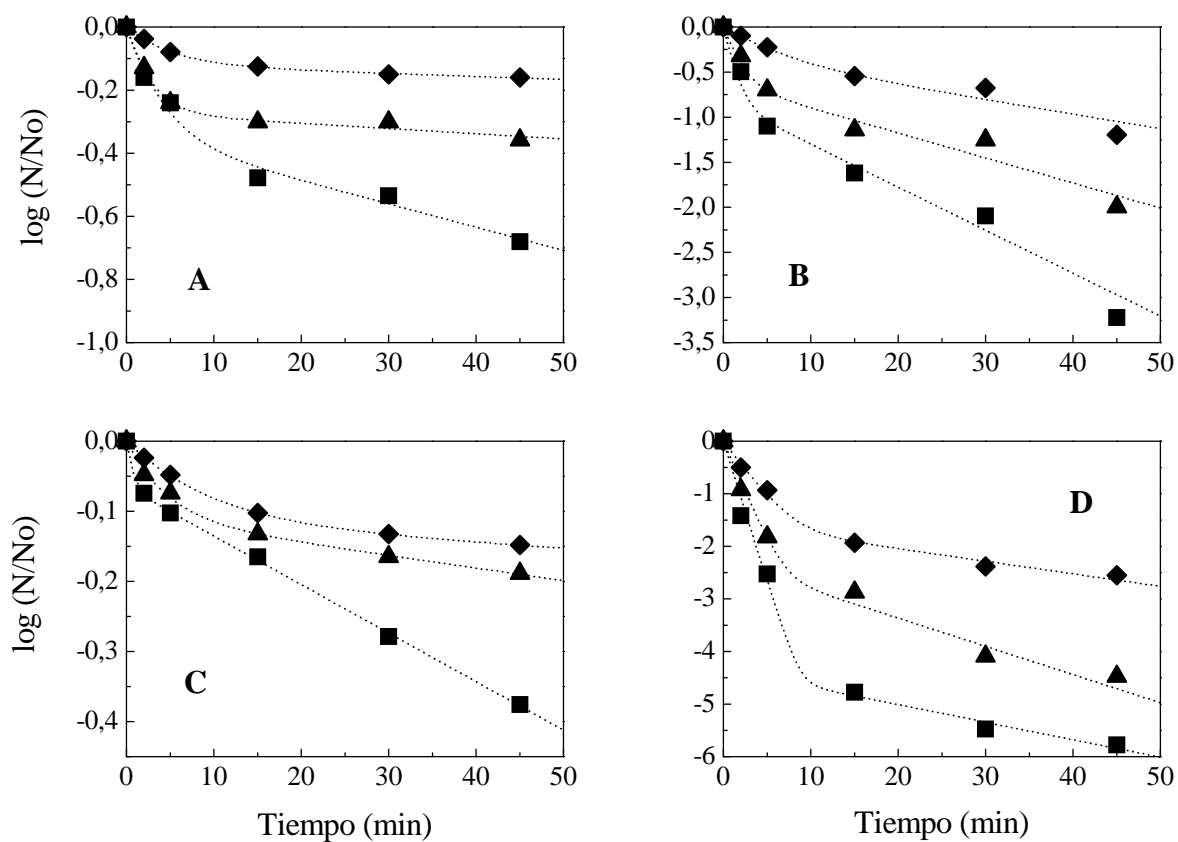


Fig. 21: Curvas teóricas de tratamiento térmico a 63 °C para los fagos BYM (A), YAB (B),

Ib<sub>3</sub> (C) y LL-H (D) en MRS (■), buffer TMG (▲) y LDR (◆).

**Tabla 8:** Parámetros cinéticos derivados de las curvas teóricas ajustadas según la ecuación (11) con datos experimentales de resistencia térmica (63°C) de fagos de *Lactobacillus delbrueckii*, en diferentes medios de suspensión.

Fago	Parámetros cinéticos								
	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )			$k_2$ (min <sup>-1</sup> )			$\gamma$		
	MRS	TMG	LDR	MRS	TMG	LDR	MRS	TMG	LDR
BYM	0,3081	0,4125	0,2103	0,0169	0,0038	0,0022	0,4578	0,5339	0,7601
YAB	0,9941	0,6837	0,2050	0,1098	0,0639	0,0369	0,1503	0,2396	0,4728
Ib <sub>3</sub>	0,9904	0,2340	0,1147	0,0160	0,0041	0,0018	0,8624	0,7779	0,4728
LL-H	1,2194	0,8785	0,5165	0,0767	0,1235	0,0550	4,524 10 <sup>-5</sup>	0,0051	0,0271

### 2.5.2- Cinéticas de muerte química

El ácido peracético (0,15%) produjo una inactivación rápida y completa de las partículas fágicas antes de 5 min de tratamiento.

El etanol, a una concentración de 100%, fue el que produjo la inactivación más rápida de los fagos ( $T_{99} \leq 22,2$  min) (Figs. 22-25 y Tabla 9). El fago Ib<sub>3</sub> exhibió la mayor resistencia frente a las soluciones de etanol, y sólo se observó una pérdida importante de actividad viral luego de los 45 min en presencia de etanol al 100%. (Fig. 24). El fago YAB fue el más sensible, ya que presentó una inactivación completa luego de 15 min de tratamiento con etanol al 100% (Fig. 23). Por otro lado, se observaron escasos o nulos efectos para todos los fagos, cuando la concentración de etanol fue de 10 y 50% (valores de  $T_{99} > 45$  min).

La viabilidad fágica fue muy poco influenciada por el isopropanol ( $T_{99} > 45$  min) (Figs. 26-29 y Tabla 9). A una concentración de 10% no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad fágica, y se observó escasa reducción de ésta luego del tratamiento durante 45 min con isopropanol al 50 o 100%.

La efectividad del hipoclorito de sodio como biocida fue fago-dependiente (Figs. 30-33 y Tabla 10). Se observó una gran resistencia del fago Ib<sub>3</sub>, el cual demostró ser el menos afectado por los tratamientos durante 45 min con 100 a 400 ppm de cloro activo (en agua destilada o buffer fosfato como medios de suspensión). Se necesitaron concentraciones de 1200 y 1400 ppm para lograr la destrucción total de las partículas virales luego de 45 o 15 min de tratamiento, respectivamente (Fig. 32). A pesar de esto, el hipoclorito de sodio fue efectivo sobre los fagos BYM, YAB y LL-H. Una concentración de 400 ppm fue suficiente para lograr una inactivación completa de las suspensiones fágicas (luego de 5 – 45 min) (Figs. 30, 31 y 33, respectivamente), con valores de  $T_{99} \leq 2$  min en los tres fagos estudiados (Tabla 10). El fago LL-H exhibió los valores más bajos de  $T_{99}$  (menores a 8,1 min) y fueron suficientes 300 ppm para lograr una inactivación completa de las partículas virales antes de los 15 min (Fig. 33).



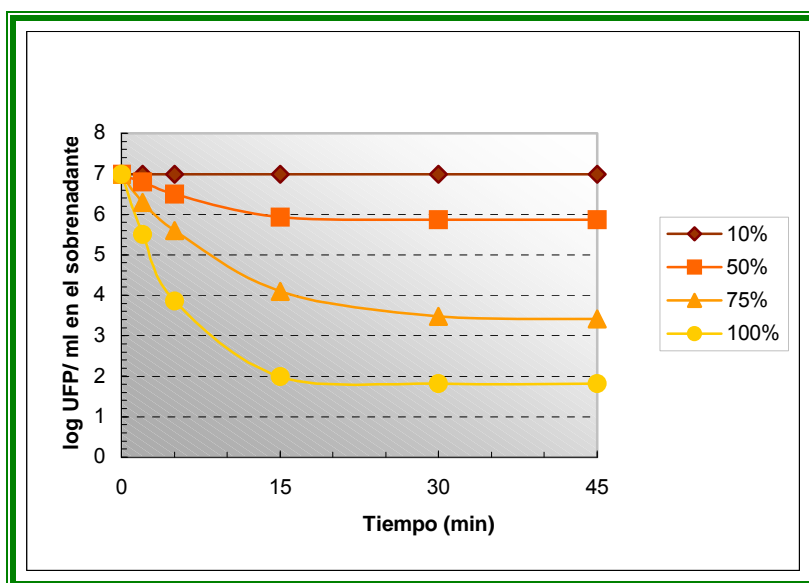


Fig. 22: Curvas de inactivación del fago BYM frente a distintas concentraciones de etanol.

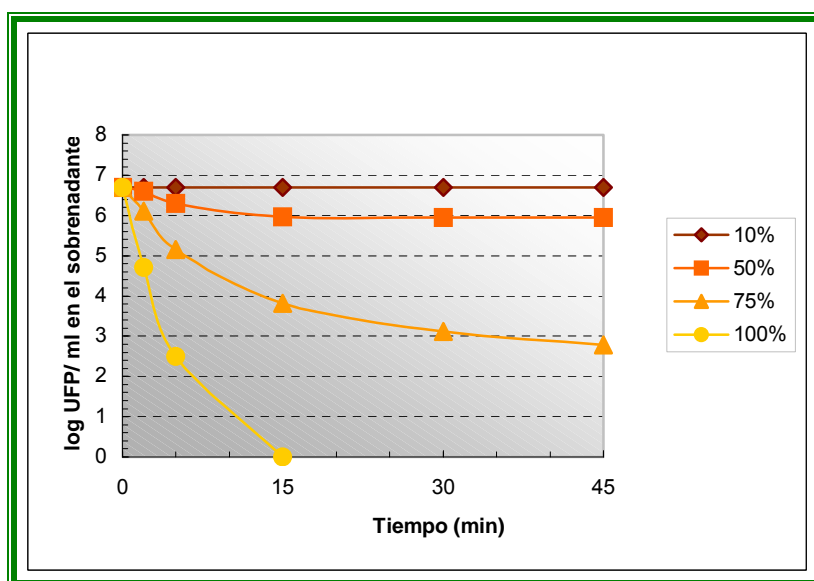


Fig. 23: Curvas de inactivación del fago YAB frente a distintas concentraciones de etanol.

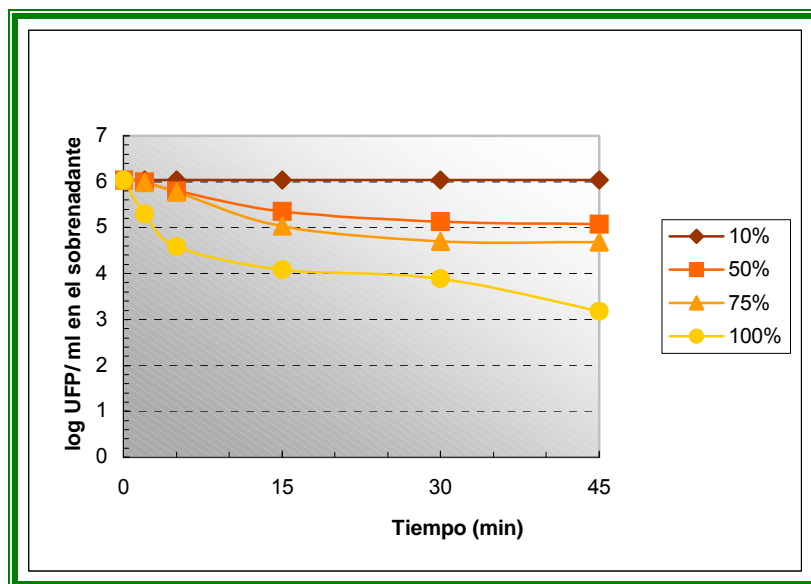


Fig. 24: Curvas de inactivación del fago  $Ib_3$  frente a distintas concentraciones de etanol.

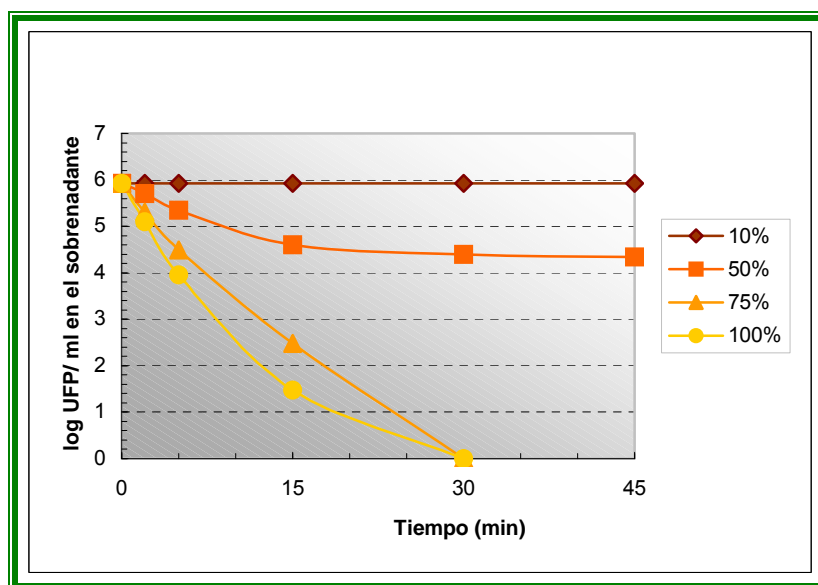


Fig. 25: Curvas de inactivación del fago LL-H frente a distintas concentraciones de etanol.

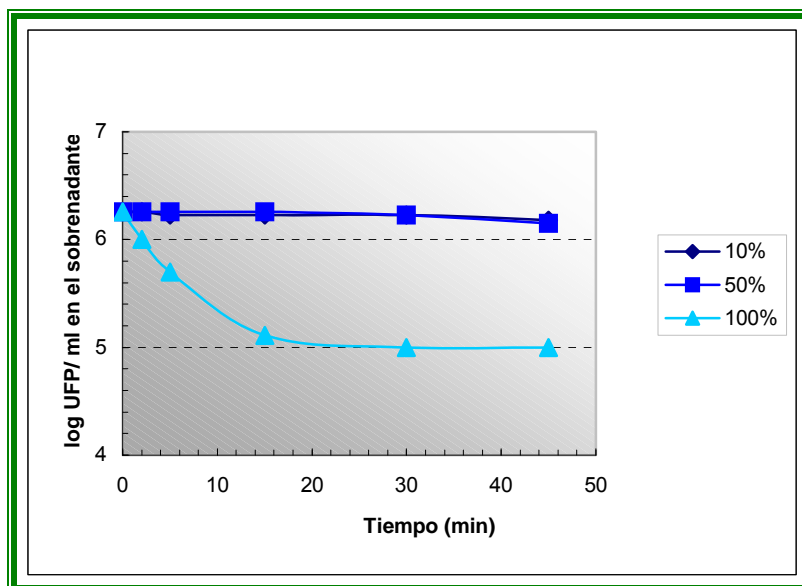


Fig. 26: Curvas de inactivación del fago **BYM** frente a distintas concentraciones de isopropanol.

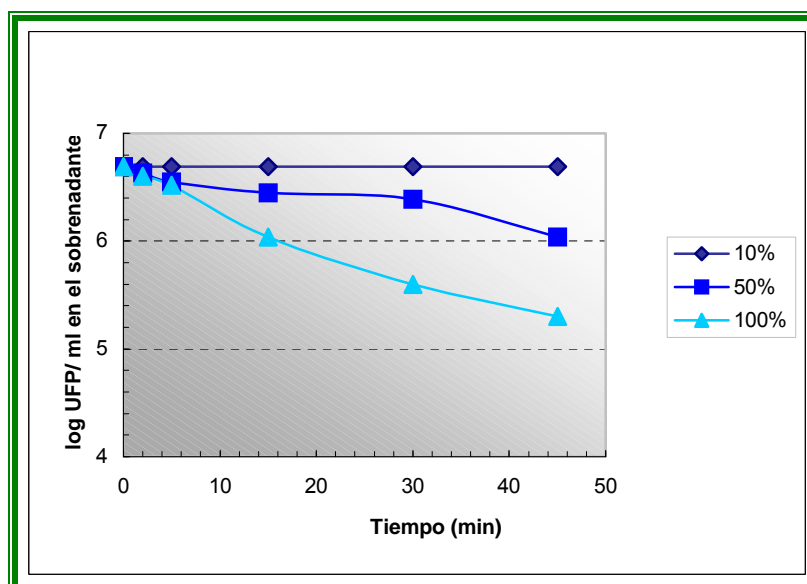


Fig. 27: Curvas de inactivación del fago **YAB** frente a distintas concentraciones de isopropanol.

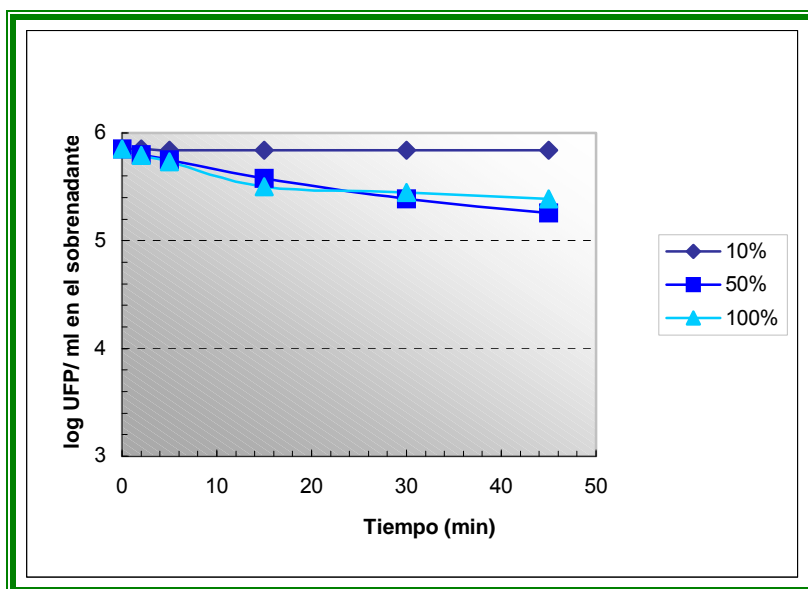


Fig. 28: Curvas de inactivación del fago  $Ib_3$  frente a distintas concentraciones de isopropanol.

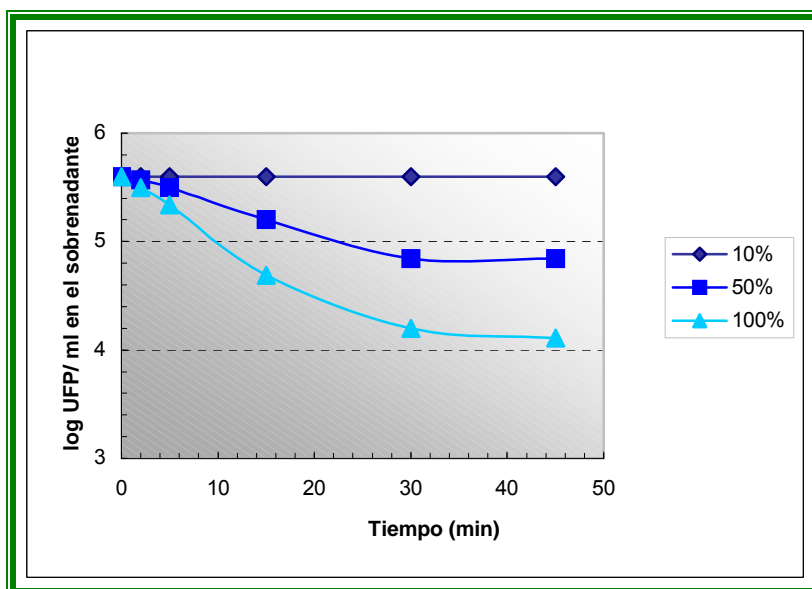


Fig. 29: Curvas de inactivación del fago LL-H frente a distintas concentraciones de isopropanol.

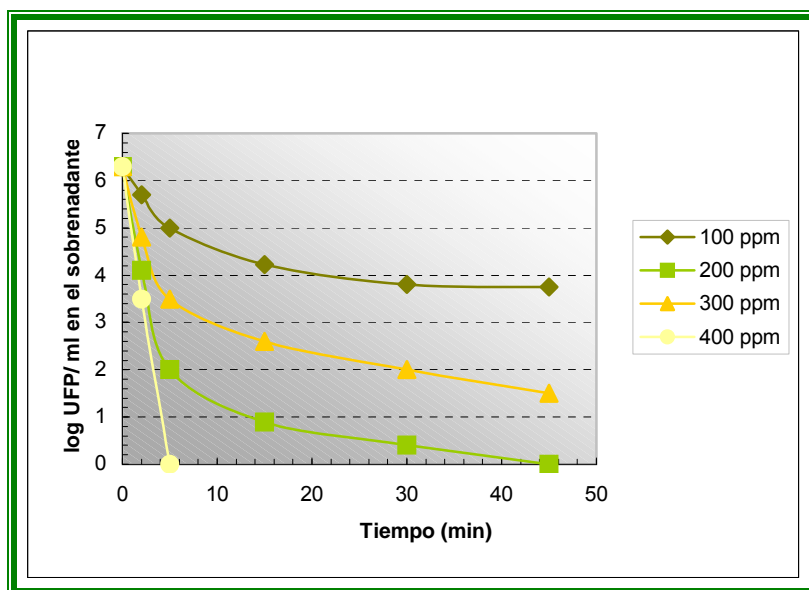


Fig. 30: Curvas de inactivación del fago **BYM** frente a distintas concentraciones de hipoclorito de sodio.

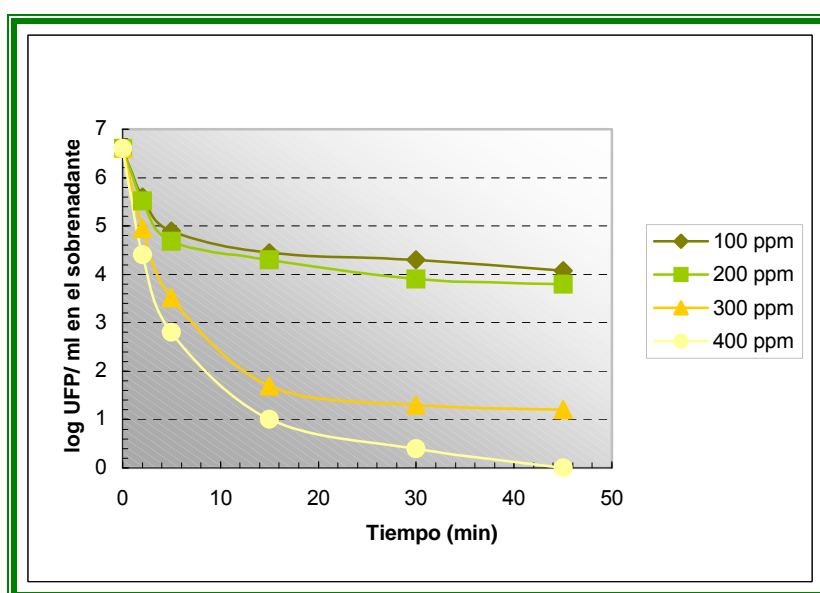


Fig. 31: Curvas de inactivación del fago **YAB** frente a distintas concentraciones de hipoclorito de sodio.

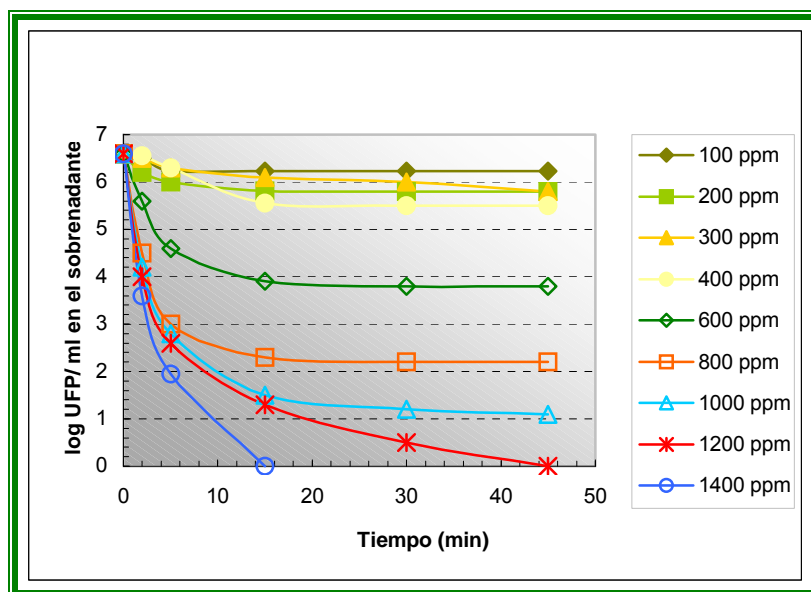


Fig. 32: Curvas de inactivación del fago  $Ib_3$  frente a distintas concentraciones de hipoclorito de sodio.

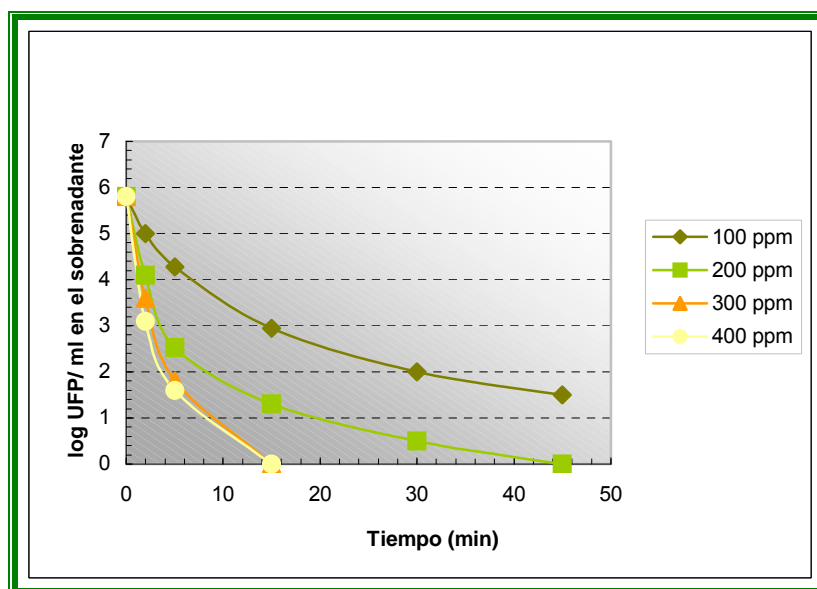


Fig. 33: Curvas de inactivación del fago LL-H frente a distintas concentraciones de hipoclorito de sodio.

**Tabla 9:** Resistencia de los fagos de *Lactobacillus delbrueckii* frente a los alcoholes etílico e isopropílico, expresado como tiempo (min) para lograr el 99% de inactivación de las partículas fágicas a temperatura ambiente ( $T_{99}$ ) (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

Fago	Biocida							
	Etanol (% v/v)				Isopropanol (% v/v)			
	10	50	75	100	10	50	100	
<b>BYM</b>	>45	>45	8,4	2,5	>45	>45	>45	
<b>YAB</b>	>45	>45	7,6	<2,0	>45	>45	>45	
<b>Ib<sub>3</sub></b>	>45	>45	>45	22,2	>45	>45	>45	
<b>LL-H</b>	>45	>45	7,4	4,8	>45	>45	>45	

**Tabla 10:** Resistencia de los fagos de *Lactobacillus delbrueckii* frente al hipoclorito de sodio, expresado como tiempo (min) para lograr el 99% de inactivación de las partículas fágicas a temperatura ambiente ( $T_{99}$ ) (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

Fago	Hipoclorito de sodio (ppm de cloro activo)									
	100	200	300	400	600	800	1000	1200	1400	
<b>BYM</b>	13,0	3,0	<2,0	-	-	-	-	-	-	
<b>YAB</b>	8,7	6,5	2,8	2,2	< 2,0	-	-	-	-	
<b>Ib<sub>3</sub></b>	>45	>45	>45	>45	5,4	2,3	2,2	2,1	<2,0	
<b>LL-H</b>	8,1	2,5	2,5	<2,0	-	-	-	-	-	

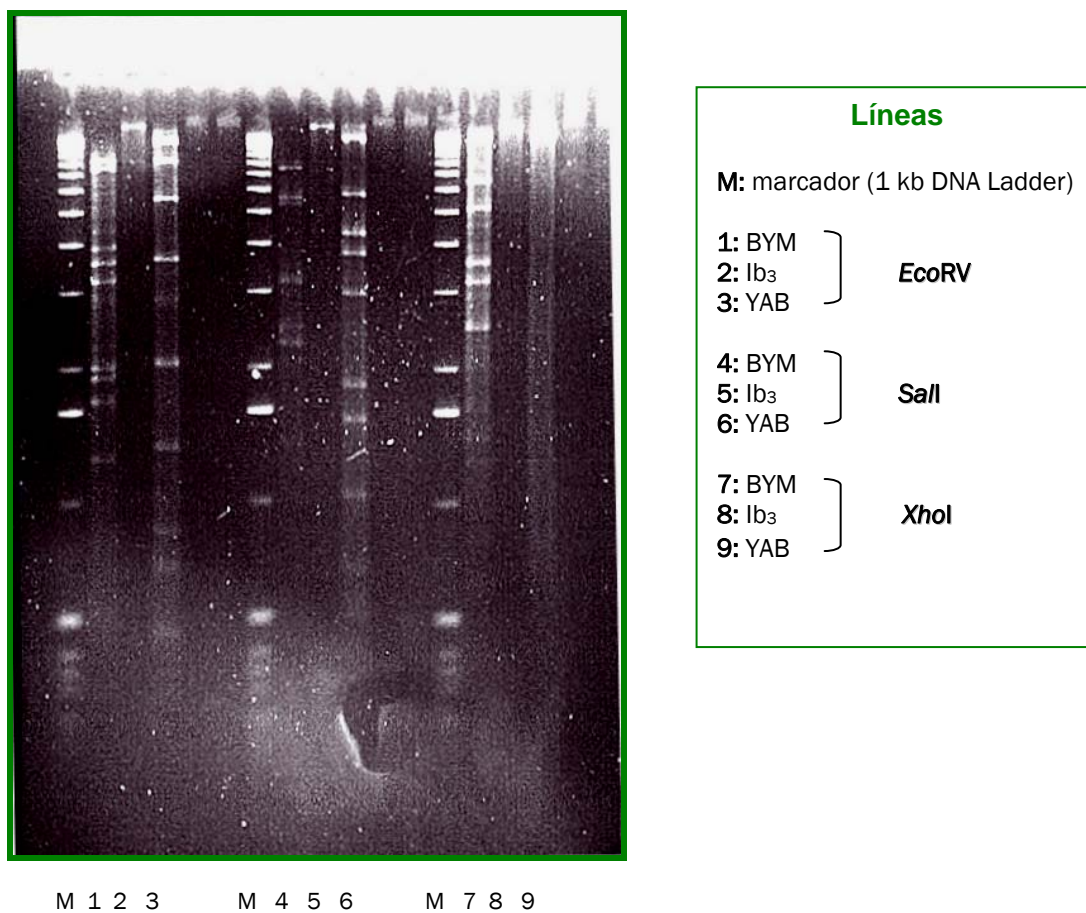
### 3- Caracterización molecular de los bacteriofagos

#### 3.1- Perfiles de Restricción

Se analizaron los genomas de los tres fagos autóctonos estudiados, los cuales fueron tratados con las enzimas *EcoRV*, *Sall*, *XhoI*, *HindIII* y *BglII*. El tamaño de los genomas se estimó en  $34,0 \pm 1,9$  kb,  $31,0 \pm 1,9$  kb y de  $33,0 \pm 1,3$  kb para los fagos YAB,  $Ib_3$  y BYM, respectivamente. Los mismos fueron estimados por la sumatoria de los tamaños de los fragmentos generados a partir de las enzimas de restricción utilizadas (Figs. 34 y 36).

Analizando las Figuras 34, podemos deducir que los tres fagos autóctonos son distintos, ya que poseen patrones de restricción diferentes con todas las enzimas utilizadas, aún cuando poseen algunas bandas en común (BYM y YAB comparten las de 3,3 y 5,2 kb, mientras que YAB e  $Ib_3$  poseen en común las bandas de 2,9 y 4,3 kb). Si observamos la Figura 36, también se ve a simple vista que estos tres fagos son totalmente diferentes, a partir de sus perfiles de restricción.





**Fig. 34:** Perfiles de restricción del ADN (electroforesis en gel de agarosa 0,8%) de los fagos **BYM**, **Ib<sub>3</sub>** y **YAB**, obtenidos con las endonucleasas *EcoRV*, *Sall* y *XhoI*.

### 3.2- Sitios de empaquetamiento (*cos*-, *pac*- sites)

Para determinar la naturaleza de los sitios de empaquetamiento, el ADN fágico ligado o no, se sometió a digestiones con endonucleasas de restricción y posterior tratamiento térmico. Los perfiles electroforéticos obtenidos con la muestra de ADN ligado y no ligado se comparan, pudiendo presentarse la situación 1 (**sitios *cos* o extremos cohesivos**) o la situación 2 (**sitios *pac***) (Fig. 35).

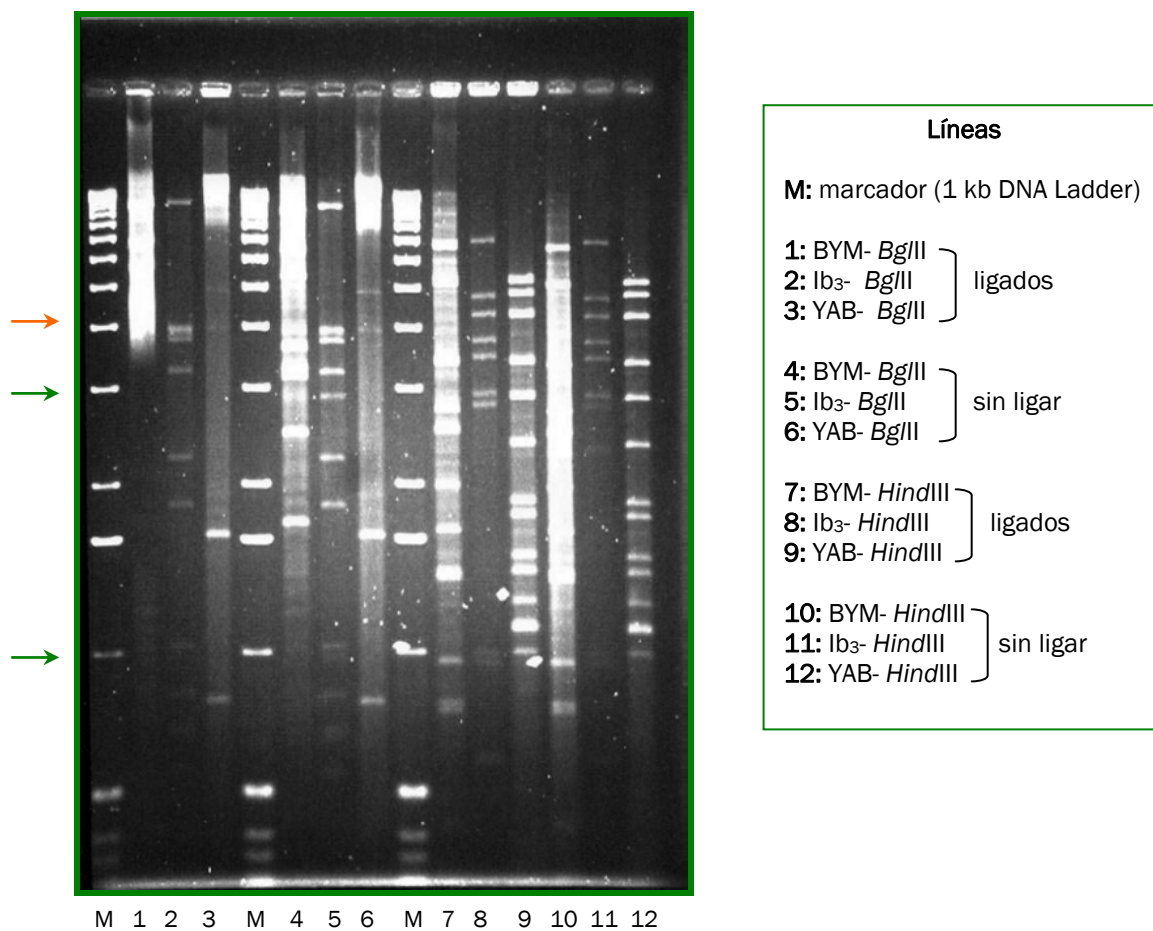


**Fig. 35:** Perfiles de restricción del ADN fágico presentando sitios *cos* (Situación 1) o sitios *pac* (Situación 2).

En el caso de que existieran sitios *cos* (Situación 1), aparecen fracciones submolares en el ADN sin ligar (**a** y **b**), y en el perfil de ADN ligado éstos desaparecen, y se produce la aparición de una banda de mayor peso molecular (**c**), correspondiente a la sumatoria de los fragmentos submolares **a** y **b**. Si los perfiles de restricción son similares tanto con ADN ligado como sin ligar significa que estamos ante la presencia de sitios *pac* (Situación 2).

En el caso del fago YAB, no se observan fragmentos submolares con ninguna de las dos enzimas utilizadas (se ven las mismas bandas para el ADN ligado y sin ligar) (Fig. 36),

por lo que puede decirse que el ADN de este fago no posee extremos cohesivos. Para el fago Ib<sub>3</sub> se observa más claramente el perfil cuando se utilizó *Bgl*II (Fig. 36). Aquí se puede ver que al ligar el ADN desaparecen las bandas de 1 y 2,9 kb, y se incrementa la intensidad de la banda de 4 kb en el perfil ligado (como consecuencia de la suma de los dos fragmentos submolares que se observan en el perfil no ligado). En el caso del fago BYM (Fig. 36) no se observan, aparentemente, fragmentos submolares que indiquen la presencia de extremos cohesivos, aunque no se podría afirmar ya que este perfil no posee demasiada nitidez por la contaminación con proteínas, cuya eliminación resultó muy difícil durante la purificación del ADN.



**Fig. 36:** Perfiles de restricción del ADN (electroforesis en gel de agarosa 0,8%), ligados y sin ligar, de los fagos **BYM**, ***lb*<sub>3</sub>** y **YAB**, obtenidos con las endonucleasas *Bgl*III y *Hind*III. Se indican las posiciones del fragmento de 4 kb (flecha anaranjada), y los fragmentos de 2,9 y 1 kb (flechas verdes) que aparecen en los perfiles ligado y sin ligar, respectivamente, del ADN del fago *lb*<sub>3</sub>.

---

#### 4- Interacción de las cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* con sus fagos específicos

##### 4.1- Efecto del ion $\text{Ca}^{2+}$ sobre la lisis en medio líquido

Los fagos YAB e  $\text{Ib}_3$  completaron el ciclo lítico sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  $\text{Ab}_1$  y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  $\text{Ib}_3$  respectivamente, sólo en presencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el fago BYM no requirió de este ion para producir la lisis sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, aunque la misma se vio retrasada en ausencia del mismo. El fago de colección LL-H, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT, también requirió del ion  $\text{Ca}^{2+}$  para completar la lisis (Tabla 11).

##### 4.2- Influencia del ion $\text{Ca}^{2+}$ en la formación de placas de lisis en medio agarizado

En este caso los tres fagos autóctonos analizados mostraron un comportamiento similar, y dio como resultado que la formación de placas de lisis en agar MRS dependió de la presencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 11).

El fago  $\text{Ib}_3$  produjo placas de nítidas, en agar MRS-Ca, de 2 a 2,5 mm de diámetro en agar MRS-Ca, sobre su cepa sensible, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  $\text{Ib}_3$ , mientras que en el mismo medio agarizado sin el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  no se observó la formación de estas placas (Fig. 37).

Algo similar ocurrió en el caso del fago YAB, ya que sólo produjo placas de lisis en agar MRS-Ca (Fig. 38). En este caso las placas de lisis producidas sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  $\text{Ab}_1$  fueron pequeñas, heterogéneas y un poco difusas, de diámetro aproximado de 1 a 1,5 mm.

En el caso del fago BYM, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, también se observó el mismo comportamiento, y las placas de lisis observadas fueron muy pequeñas, puntiformes, de un diámetro aproximado de 0,5-1 mm (Fig. 39).

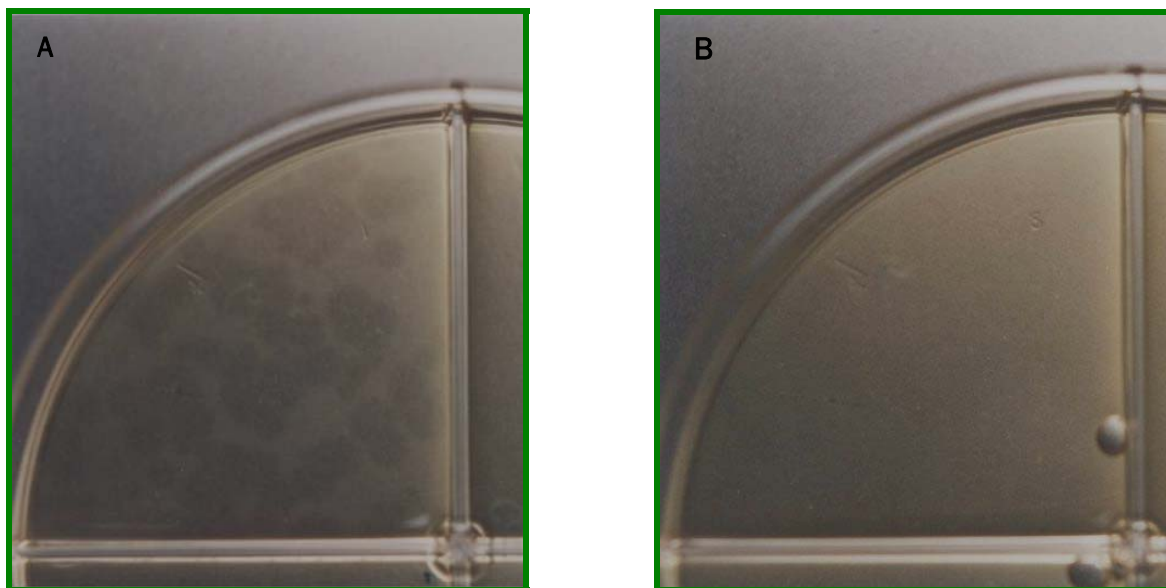
El caso del fago de colección LL-H, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT fue diferente, ya que se evidenció formación de placas de lisis aún en el medio agarizado sin el agregado del ion  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque en ausencia de este catión el tamaño de las placas fue menor (Fig. 40 y Tabla 11).

**Tabla 11:** Requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  para la actividad lítica de fagos de *Lb. delbrueckii* en caldo MRS y en agar MRS (formación de placas de lisis visibles).

Sistema Fago/Cepa sensible	Requerimiento de $\text{Ca}^{2+}$	
	Caldo MRS	Agar MRS
YAB/ <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab <sub>1</sub>	SI	SI
lb <sub>3</sub> / <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> lb <sub>3</sub>	SI	SI
BYM/ <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YSD V	NO <sup>a</sup>	SI
LL-H/ <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> LKT	SI	NO <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: lisis tardía en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$

<sup>b</sup>: placas de lisis más pequeñas en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$



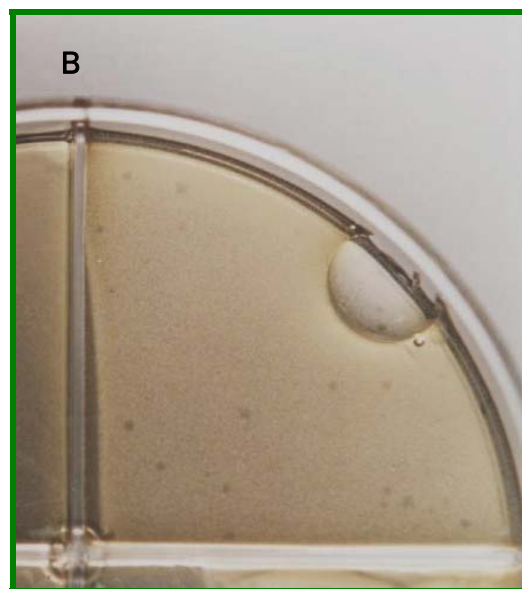
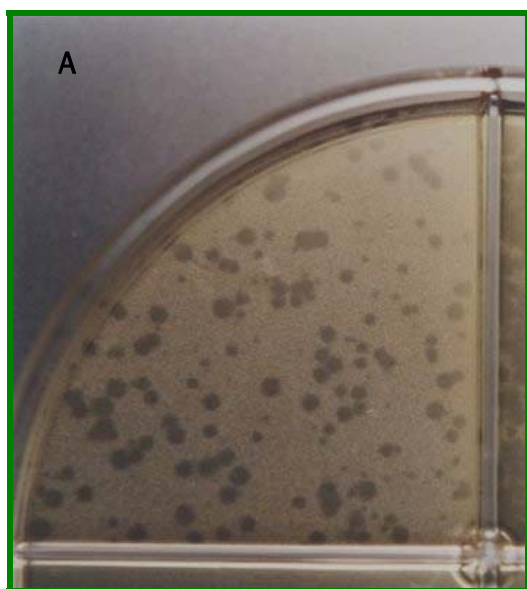
**Fig. 37:** Morfología de las placas de lisis del fago I<sub>b3</sub> en Agar MRS (A) y Agar MRS-Ca (B), sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* I<sub>b3</sub>.



**Fig. 38:** Morfología de las placas de lisis del fago YAB en Agar MRS-Ca, sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>.



**Fig. 39:** Morfología de las placas de lisis del fago BYM en Agar MRS-Ca, sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V.



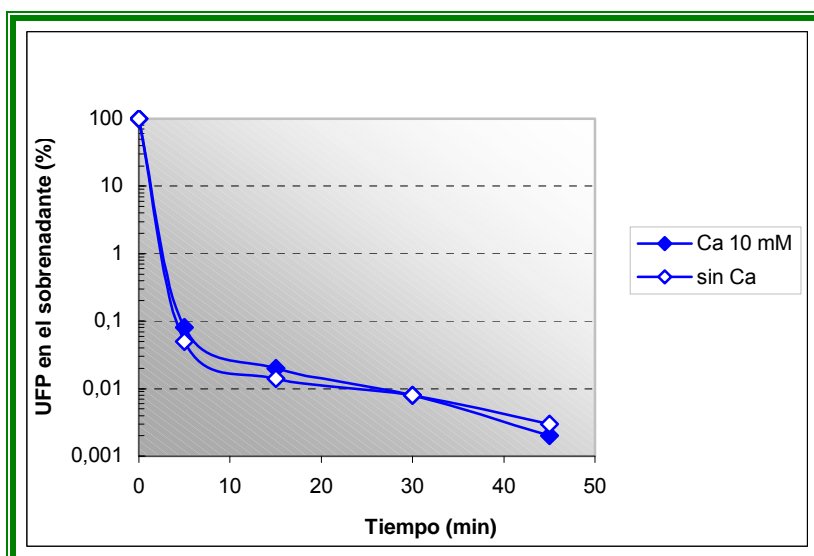
**Fig. 40:** Morfología de las placas de lisis del fago LL-H en Agar MRS (A) y Agar MRS-Ca (B), sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT.



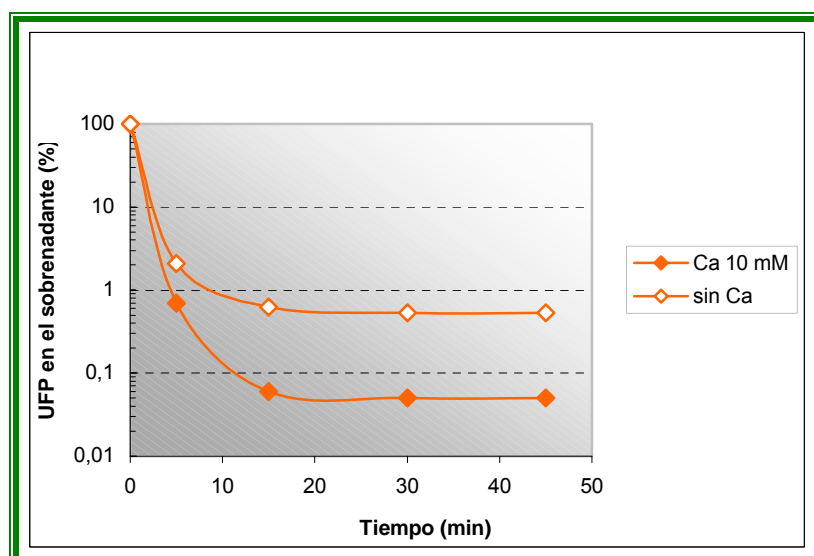
## 5. Adsorción

### 5.1- Influencia del ion $\text{Ca}^{2+}$ sobre la adsorción

En general no se observó una influencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en la etapa de adsorción fágica. Todos los fagos estudiados mostraron una rápida adsorción a sus correspondientes cepas sensibles, alcanzando su valor máximo entre los 30 y 50 min de incubación. Las Figuras 41-44 representan las cinéticas de adsorción de los fagos estudiados sobre sus cepas sensibles, en presencia y ausencia de  $\text{CaCl}_2$  (10 mM).



**Fig. 41:** Influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la adsorción del fago YAB a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub> (los valores representan el promedio de tres determinaciones).



**Fig. 42:** Influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la adsorción del fago BYM a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

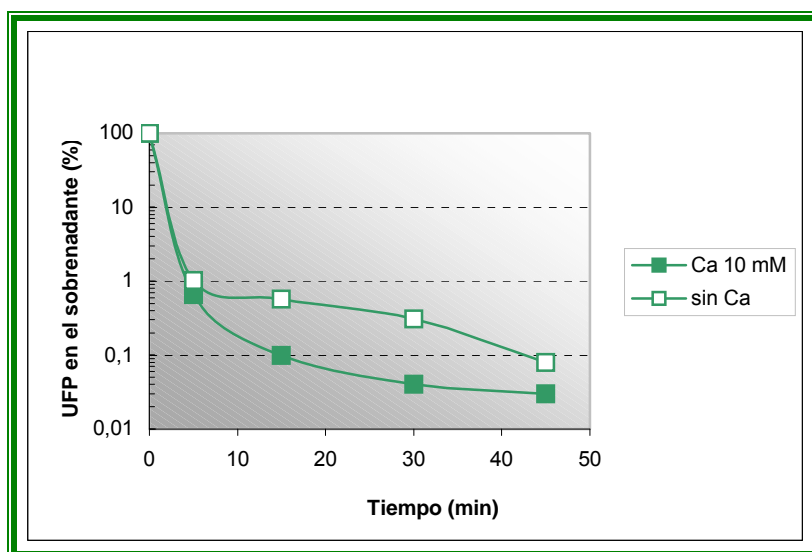


Fig. 43: Influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la adsorción del fago  $I_{b_3}$  a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  $I_{b_3}$  (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

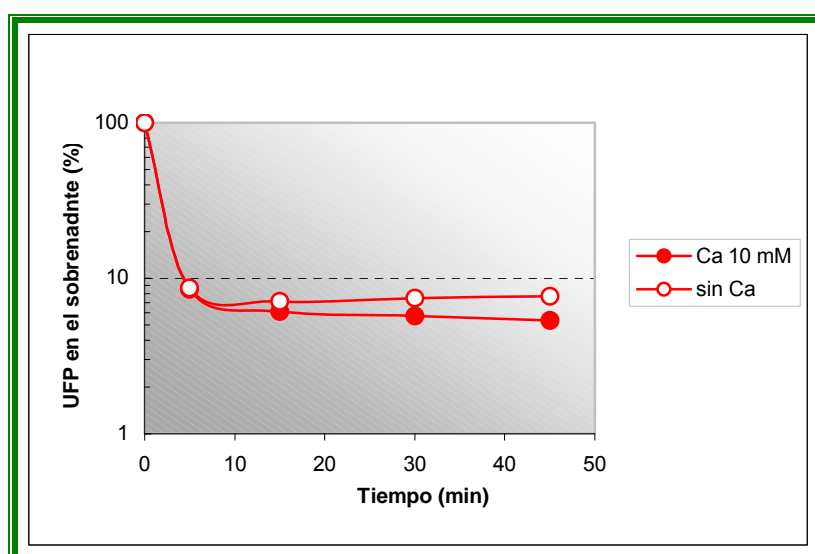


Fig. 44: Influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la adsorción del fago LL-H a *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

## **5.2- Influencia de la temperatura de incubación**

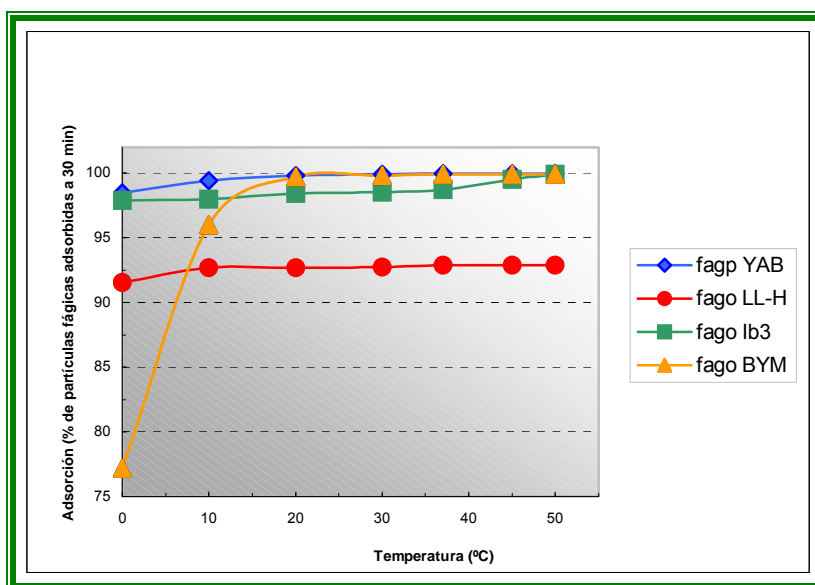
El efecto de la temperatura sobre la adsorción fágica se muestra en la Figura 45. Sólo en el caso del fago BYM hubo influencia de la temperatura entre 0 °C y 20 °C (las tasas de adsorción fueron de 77,2% y 98,2%, respectivamente). Entre 20 °C y 50 °C no hubo influencia significativa de la temperatura sobre la tasa de adsorción de este fago.

Para el resto de los fagos (YAB, Ib<sub>3</sub> y LL-H), no se observó una influencia importante de la temperatura sobre la adsorción sobre sus respectivas cepas sensibles. Los fagos YAB e Ib<sub>3</sub> mantuvieron una tasa de adsorción cercana al 100% en todo el rango de temperatura estudiado, mientras que el fago de colección LL-H mostró un valor de 91,5% a 0 °C, y de 92,7% a partir de los 10 °C.

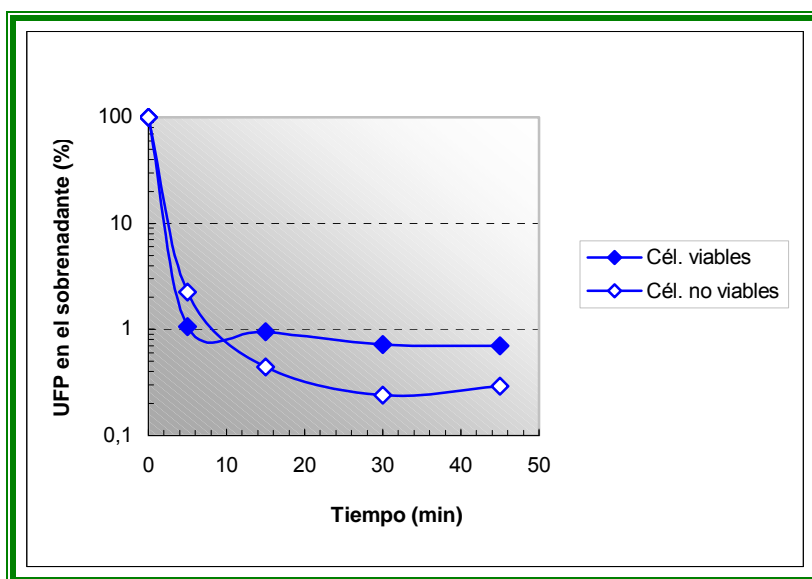
En todos los casos estudiados, se observó que la temperatura necesaria para una adsorción máxima coincidió con la temperatura óptima de desarrollo de sus cepas sensibles, que se encuentra entre los 40 y 50 °C.

## **5.3- Influencia del estado fisiológico celular**

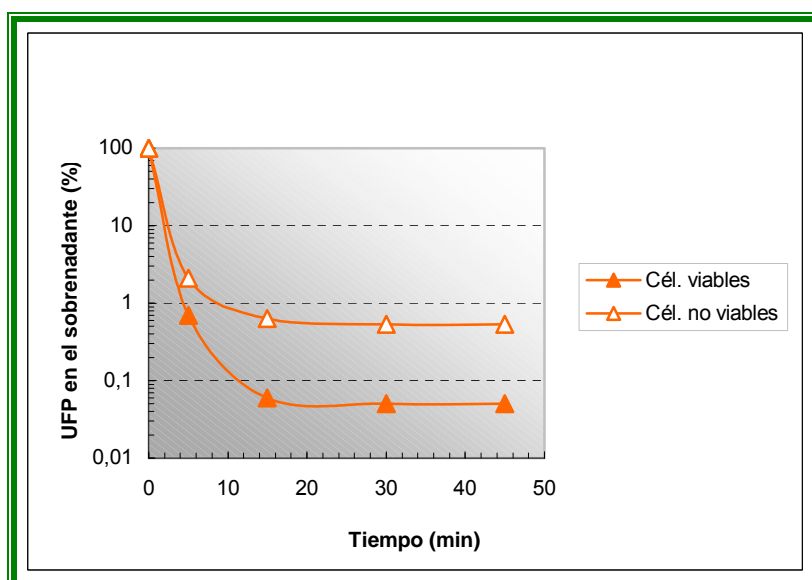
Como lo muestran las Figuras 46- 49, se observó una adsorción normal de todos los fagos estudiados, tanto sobre células viables como no viables (sometidas a 100 °C durante 10 min).



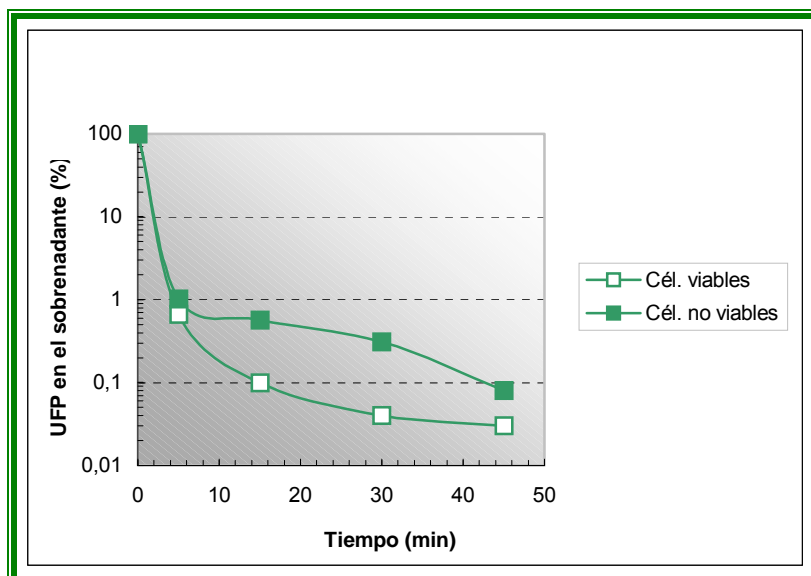
**Fig. 45:** Influencia de la temperatura sobre la adsorción de los fagos YAB, lb<sub>3</sub>, BYM y LL-H a sus cepas sensibles (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>, lb<sub>3</sub> e YSD V, y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT, respectivamente) (los valores representan el promedio de tres determinaciones).



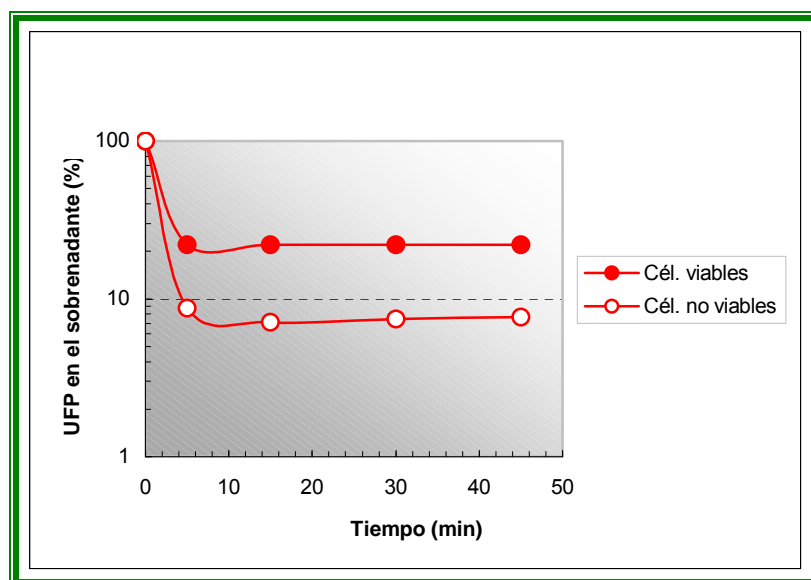
**Fig. 46:** Influencia del estado fisiológico celular sobre la adsorción del fago YAB a células de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub> (los valores representan el promedio de tres determinaciones).



**Fig. 47:** Influencia del estado fisiológico celular sobre la adsorción del fago BYM a células de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V (los valores representan el promedio de tres determinaciones).



**Fig. 48:** Influencia del estado fisiológico celular sobre la adsorción del fago  $Ib_3$  a células de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  $Ib_3$  (los valores representan el promedio de tres determinaciones).



**Fig. 49:** Influencia del estado fisiológico celular sobre la adsorción del fago LL-H a células de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

## 6- Identificación de receptores fágicos

### 6.1- Ensayos de adsorción sobre paredes tratadas química y enzimáticamente

Con respecto a la preparación de las paredes celulares, se siguió el protocolo puesto a punto por Stiefel (2000). La eficacia de la rotura fue monitoreada mediante la microtécnica de recuento bacteriano en placa, y se midió como la disminución en la concentración de células enteras (células viables), la que fue mayor a 99% en los cuatro casos estudiados (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>, Ib<sub>3</sub> e YSD V, y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326).

En el caso de los tres fagos autóctonos estudiados (YAB, Ib<sub>3</sub> y BYM) el control de adsorción sobre paredes purificadas resultó ser el recomendado por la técnica de adsorción a paredes, es decir, superior a 95%. Para el caso del fago de colección Ib539 (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326), el control de adsorción fue levemente inferior (aproximadamente de 90%).

La Tabla 12 muestra los valores obtenidos para los diferentes tratamientos realizados sobre las paredes puras de las cepas sensibles.

Los tratamientos con proteinasa K, enzima que hidroliza las uniones peptídicas, y el tratamiento con SDS 1%, sustancia que actúa removiendo y desnaturalizando proteínas de la pared e incluso aquellas ancladas a la membrana, no afectaron de manera importante la capacidad de unión de las partículas fágicas a las paredes de sus respectivas cepas sensibles, sobre todo para los fagos YAB e Ib<sub>3</sub>.

El tratamiento con mutanolisina, enzima que hidroliza el peptidoglicano de la pared, redujo de manera apreciable la adsorción de los fagos (que resultó no mayor a 38%), al compararlos con los valores de los controles.

El tratamiento con TCA 5% actúa extrayendo una fracción soluble de los polisacáridos y dejando sobre la pared sólo una fracción insoluble del peptidoglicano y los ácidos teicoicos (Callegari, 1992; Callegari y col., 1998). En este caso también se observó



una disminución importante de la adsorción en todos los sistemas fago/cepa sensible estudiados (valores menores a 21%). Esto podría estar indicando la existencia de receptores con un componente de naturaleza glicosilada, descartando, por otro lado, la naturaleza proteica de los mismos.

**Tabla 12:** Adsorción (% de partículas fágicas adsorbidas luego de 30 min a 42°C) de los fagos YAB,  $\phi$ Ib<sub>3</sub>, BYM y  $\phi$ Ib539 a paredes celulares tratadas, de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>, Ib<sub>3</sub> e YSD V, y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326, respectivamente (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

Tratamiento	Porcentaje de Adsorción			
	$\phi$ YAB	$\phi$ Ib <sub>3</sub>	$\phi$ BYM	$\phi$ Ib539
Control	97,75	99,51	98,65	90,00
Proteinasa K	95,40	99,70	73,00	78,50
SDS 1%	96,05	99,49	64,00	85,50
Mutanolisina	27,50	38,00	0,41	25,50
TCA 5%	0	21,50	17,00	0

## 6.2- Ensayo de neutralización de fagos con monosacáridos

En el caso del fago YAB, no se observó ningún efecto inhibitorio de los azúcares con respecto a la adsorción de este fago sobre su cepa sensible, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>, excepto por la glucosa, que produjo una baja inhibición (25%) de la adsorción.

Con respecto al fago Ib<sub>3</sub>, los resultados fueron mucho menos claros y más variables, pero se podría decir que ninguno de los azúcares testeados produjo una inhibición significativa de la adsorción, situándose los valores entre 0 y 17%.

No se observó tampoco una importante inhibición de la adsorción del fago BYM sobre *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, y del fago de colección Ib539, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326, ya que los porcentajes de inactivación fueron muy bajos o nulos con todos los azúcares ensayados (Tabla 13).

Los resultados obtenidos al usar buffer Tris-HCl (50 mM, pH 6,8) o agua bidestilada estéril como diluyentes para la preparación de las soluciones de los monosacáridos fueron similares, por lo que se llegó a la conclusión de que las variaciones encontradas en los resultados no dependían de ninguna manera del tipo de diluyente utilizado.

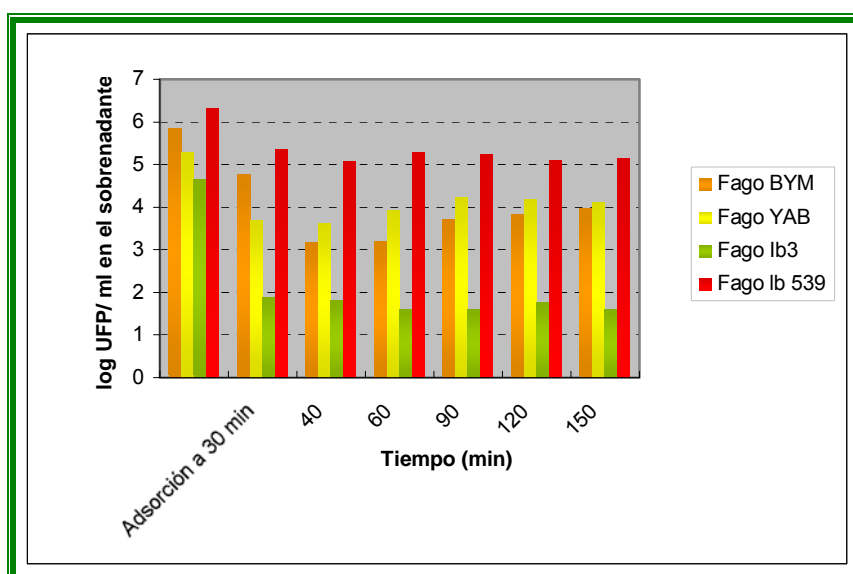
**Tabla 13:** Ensayo de inactivación de la adsorción fágica con monosacáridos (500 mM) en Tris-HCl (50 mM, pH 6,8) de los fagos YAB, Ib<sub>3</sub>, BYM y Ib539 a paredes celulares tratadas, de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>, Ib<sub>3</sub> e YSD V, y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326, respectivamente (los valores representan el promedio de tres determinaciones).

Monosacárido	Inactivación de la Adsorción Fágica (%)			
	$\phi$ YAB	$\phi$ Ib <sub>3</sub>	$\phi$ BYM	$\phi$ Ib539
Glucosa	25,50	10,22	0	0
Galactosa	0	17,65	0	0
Ramnosa	0	12,30	13,05	0
Ribosa	0	0	0	0
Manosa	0	15,00	0	21,55
Glucosamina	0	16,73	0	5,25
N-Acetilglucosamina	0	10,28	17,44	6,35

### 6.3- Reversibilidad en la unión de los fagos adsorbidos a paredes celulares purificadas

Este ensayo permitió hacer una primera aproximación acerca del tipo de unión existente entre los fagos y los receptores ubicados en la superficie de las paredes celulares purificadas.

Luego de 30 min de contacto entre las suspensiones fágicas y las paredes de las células sensibles, se observaron adsorciones de 96,8% (fago YAB), 99,8% (fago Ib<sub>3</sub>), 91% (fago BYM) y 89% (fago Ib539). Luego de resuspender estas paredes y fagos adsorbidos en buffer para analizar la posible desorción de éstos, se observó que no existió un aumento significativo de partículas fágicas libres durante 150 min. Esto significa que la unión fago-receptor es lo suficientemente fuerte como para considerarse irreversible en todos los casos estudiados (Fig. 50).



**Fig. 50:** Irreversibilidad de la adsorción fágica a paredes celulares puras de *Lb. delbrueckii* (Fagos en el sobrenadante luego de la adsorción, 30 min - 42 °C). Las barras identificadas "Control" indican las concentraciones iniciales de fagos puestas en contacto con las paredes celulares.

# DISCUSIÓN

---

La aplicación más extendida de los cultivos termófilos es, sin duda alguna, en la elaboración de yogur, donde se utiliza una combinación de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, los cuales interactúan en la leche de manera favorable para ambos. Esta cooperación del cultivo mixto se manifiesta con una gran producción de ácido, mayor que la suma de la producción de ácido de los cultivos puros por separado. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, por otra parte, integra normalmente los fermentos artesanales de suero para quesos duros italianos (Auclair y Accolas, 1983; Reinheimer, 1994, Reinheimer y col., 1996).

La infección fágica es considerada mundialmente la causa más importante de problemas de acidificación en cultivos lácticos utilizados en la industria láctea fermentativa (producción de quesos y leches fermentadas). El ataque por fagos ocasiona la lisis de las células bacterianas que conforman el cultivo starter, obstaculizando el normal crecimiento y desarrollo de acidez de los fermentos (Forde y Fitzgerald, 1999).

Los ataques por fagos a bacterias lácticas termófilas integrantes de cultivos starters, se convirtieron en la principal causa de fermentaciones lentas o defectuosas en la industria láctea argentina, a partir del reemplazo de los fermentos naturales (que poseían gran resistencia fágica) por fermentos comerciales importados, compuestos por cepas sensibles a los fagos autóctonos. Esto se ve agravado por el uso de un escaso número de cepas en su formulación ya que, ante un ataque fágico, las consecuencias son mucho más visibles.

A partir de elaboraciones industriales defectuosas de yogur, fue posible aislar en nuestro país, los tres primeros fagos autóctonos, líticos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

De la escasa información que existe acerca de estos fagos y su interacción con estas bacterias lácticas termófilas, se deduce la importancia de ampliar los conocimientos sobre estos puntos, siendo indispensables a la hora de plantear estrategias de defensa eficaces.

Las micrografías electrónicas del fago BYM, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YSD V, revelaron la presencia de una cabeza isométrica, cola larga y no contráctil, y una estructura de collar. En el caso de los fagos YAB e Ib<sub>3</sub>, líticos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub> e Ib<sub>3</sub> respectivamente, esta estructura no se presenta, pero

el resto de las características son similares, lo que permitió clasificarlos taxonómicamente dentro del grupo B de Bradley (1967) y en el morfotipo B1 de la familia *Siphoviridae*, según el criterio de Ackermann (1984). Se han observado similitudes a nivel morfológico entre los fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Estudios realizados sobre el fago LL-H (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) (Alatossava y col., 1998) y el fago ch2 (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2) (Chow, 1988) mostraron características en común: ambos poseen cabezas de 50 nm de diámetro, colas largas no contráctiles de 170 a 180 nm de longitud, y un genoma de 34 a 35 kb. Asimismo, las partículas del fago lb539, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326, poseen una cabeza icosaédrica de 47 nm y una cola larga, no contráctil de 159 nm. Por todas estas características morfológicas, el fago lb539 también se clasifica dentro de la familia *Siphoviridae* (según Ackermann), y en el grupo B1 de la clasificación de Bradley (1967). Muchos fagos son capaces de atacar tanto a cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, lo que indica que el rango de huéspedes no se limita necesariamente a una subespecie. Este hallazgo es consistente con el alto grado de similitud entre *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Jarvis, 1988).

Los ciclos de multiplicación de los tres fagos autóctonos estudiados mostraron valores de burst size (número de partículas fágicas liberadas por centro de infección) de entre 23 y 48, y períodos de latencia de entre 20 y 40 min. Existen escasos trabajos relativos a las curvas de multiplicación para fagos específicos de bacterias lácticas termófilas. Para el fago ch2, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2, se han reportado valores de 130 partículas/ centro de infección para el burst size, con períodos de latencia de 40 min (Chow, 1988). Para el fago hv, lítico de *Lb. helveticus* ATCC 15807, se obtuvo un período de latencia de 100 min, 100 partículas/ centro infectivo para el burst size, y un burst time (tiempo en minutos en el cual se alcanza el valor de burst; es decir que luego de este tiempo todas las células han sido lisadas por los fagos, y se alcanza el número máximo de partículas liberadas por el total de centros de infección: "burst size") de 300 min. Para el fago

ATCC 15807-B1, también lítico de *Lb. helveticus* ATCC 15807, el período de latencia fue de 80 min, alcanzando un burst size de 100 partículas/ centro infectivo, y un burst time de 250 min (Quiberoni, 1997). Los parámetros informados para el fago y8, lítico de *Lb. acidophilus* Y8, fueron de 100 partículas/ centro de infección para el burst size, y de 30 a 40 min para el período de latencia (Kiliç, 1996). Los datos encontrados en la bibliografía con respecto a fagos de *S. thermophilus* muestran valores de burst size entre 300 y 600, con períodos de latencia inferiores a 30 min (Suárez y col., 2002). Algunos autores informan, para fagos de *Lactococcus* (bacteria láctica mesófila), valores de burst size comprendidos entre 100 y 250 partículas fágicas/ centro infectivo y períodos de latencia variables entre 20 y 28 min (Lodics, 1990; Kim, 1991). De lo expuesto surge que los burst size de los fagos autóctonos YAB, Ib<sub>3</sub> y BYM son algo inferiores a los encontrados en la bibliografía para los fagos líticos de la misma especie, aunque los períodos de latencia se encuentran en el rango de los datos reportados para otros fagos de lactobacilos.

Los fagos autóctonos YAB, Ib<sub>3</sub> y BYM mostraron una menor conservación de la viabilidad con respecto a los fagos de colección LL-H y Ib539, cuando se los almacenó a 4 °C. La viabilidad durante el almacenamiento a -20 °C y -80 °C del fago Ib<sub>3</sub> fue mayor que la observada a la temperatura de refrigeración (4 °C). Sorpresivamente, se vio una gran disminución de la viabilidad de los fagos de colección LL-H y Ib539 durante el almacenamiento a -20 °C, aunque la viabilidad a -80 °C fue muy buena y superior a la observada durante la conservación a 4 °C y -20 °C para ambos fagos. Con respecto a los fagos hv y ATCC 15807-B1 (líticos de *Lb. helveticus* ATCC 15807), se observó una caída paulatina de su viabilidad a 4 °C. Después de dos años, los títulos de las suspensiones fágicas descendieron tres órdenes logarítmicos. La viabilidad durante la conservación a -20 °C para el fago hv se mantuvo aproximadamente durante ocho meses, después de lo cual exhibió un leve descenso. En cambio, la viabilidad del fago ATCC 15807-B1 descendió en forma dramática durante toda la experiencia, cayendo tres órdenes logarítmicos en el primer año de conservación. Durante el almacenamiento a -80 °C, ambos fagos (hv y ATCC



---

15807-B1) mantuvieron su viabilidad, y después de un año de conservación los títulos mantuvieron los valores iniciales (Quiberoni, 1997).

Al analizar la viabilidad de los fagos estudiados en medios de suspensión que fueron ajustados a distintos pH, fue posible observar que en general resultó muy afectada a los pH extremos (entre 1-35% de UFP viables a pH 4 y entre 10-95% de UFP viables a pH 8, luego de 30 min de incubación) y buena entre pH 5 y 7, lo cual no permitió analizar su influencia sobre la adsorción de los fagos a sus cepas sensibles, aunque ésta fue normal en el estrecho rango de pH 5 a 7. En un trabajo realizado sobre fagos autóctonos de *S. thermophilus* (Binetti, 2001), se observó que los controles de viabilidad pusieron en evidencia una importante inactivación (> 91%) de las partículas fágicas a pH 3, mientras que entre pH 4 y 8,5 exhibieron una marcada estabilidad. Como se puede observar, estos resultados difieren de los hallados para los fagos autóctonos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YAB, BYM e Ib<sub>3</sub>, así como para el fago de colección LL-H, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT. La adsorción para los fagos de *S. thermophilus* resultó cercana al valor máximo (> 91%) aún a pH 4, excepto en el caso del fago 0BJ, que se adsorbió sólo un 63% a su cepa sensible. La velocidad máxima de adsorción para estos fagos de *S. thermophilus*, fue detectada para valores de pH comprendidos entre 6 y 7, disminuyendo ligeramente cuando el pH del medio fue 8,5. En ese trabajo se destaca como interesante el dato de que el pH óptimo para la adsorción de todos los fagos fue el pH normal de la leche, cercano a la neutralidad (Binetti, 2001). Resultados similares se obtuvieron para fagos de *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1998). La escasa estabilidad a pHs ácidos 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 fueron aislados.

En el presente trabajo también se investigó la resistencia térmica (63 °C, 72 °C y 90 °C) en distintos medios de suspensión (caldo MRS, LDR y buffer TMG), de los tres fagos autóctonos (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) y de uno de los fagos de colección (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*). Los fagos BYM e Ib<sub>3</sub> fueron los más resistentes al tratamiento a 63

°C, ya que los valores de  $T_{99}$  fueron mayores de 45 min en los tres medios de suspensión utilizados. El fago de colección LL-H presentó una baja resistencia al tratamiento a 63 °C en los tres medios de suspensión ensayados, aunque la viabilidad fue algo superior cuando se utilizó LDR como medio de suspensión. Algo similar ocurrió con el fago YAB, cuya termorresistencia fue mayor en LDR ( $T_{99}$  mayor a 45 min), lo que indica un efecto protector de los componentes de la leche sobre estos dos fagos a esta temperatura. Estos resultados revelan una clara influencia del medio de suspensión usado en la mayor o menor resistencia térmica de los fagos estudiados. Para los fagos de *Lb. delbrueckii* estudiados, el caldo MRS fue el medio de suspensión menos protector, y la leche fue el que brindó mayor protección. Cuando los fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se calentaron a 72 °C en el presente estudio, se observó una rápida reducción del número de partículas virales viables, con valores de  $T_{99}$  menores a 3 min en los tres medios de suspensión ensayados, tanto para los fagos BYM, YAB e  $Ib_3$  como para el fago de colección LL-H. Un tratamiento de 5 min a 90 °C fue suficiente para obtener recuentos menores a 10 UFP/ ml en los tres medios de suspensión en el caso de los fagos BYM, YAB y LL-H, mientras que el fago  $Ib_3$  mostró una mayor termorresistencia a esta temperatura, siendo necesarios 15 min para obtener su inactivación completa en LDR, y 5 min en buffer TMG y caldo MRS. Observando los resultados obtenidos, vemos que el fago  $Ib_3$  presentó claramente una mayor resistencia a los tratamientos térmicos efectuados, con relación al resto de los fagos estudiados. Auad y col. (1997) informaron una alta sensibilidad a la temperatura de un fago temperado de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ya que el número inicial de partículas virales se redujo un 90%, 99,9% y 99,999% luego de 60 min a 50, 60 y 70 °C, respectivamente. Los fagos hv y ATCC 15807-B1 (ambos líticos de *Lb. helveticus* 15807), a diferencia de los fagos de *Lb. delbrueckii* estudiados en esta Tesis, mostraron una baja termorresistencia, ya que fueron suficientes 5 min a 72 °C para provocar la inactivación completa de las partículas fágicas en los tres medios de suspensión utilizados (caldo MRS, LDR y buffer TMG), siendo los  $T_{99}$  menores a 2 min tanto para el fago hv como para el fago ATCC 15807-B1. Los fagos CNRZ

832-B1 y CNRZ 0241 (líticos de *Lb. helveticus* CNRZ 892), revelaron mayor termorresistencia, y sólo se produjo su inactivación completa luego de un tratamiento de 5 min a 90 °C (Quiberoni y col., 1999). Similares resultados se obtuvieron para fagos autóctonos de *S. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000) y lactococos (Suárez y Reinheimer, 2000). Sozzi y Maret (1975) reportaron que el fago I112, lítico de *Lb. helveticus*, y el fago 265, lítico de *S. thermophilus*, no fueron inactivados luego de una exposición durante 1 h a 65 °C, pero sí perdían su viabilidad luego de una incubación a 72 °C durante 1 h, ó 20 seg a 90 °C. El tratamiento térmico a 60 °C durante 10 min sobre el fago y8, lítico de *Lb. acidophilus* Y8, permitió una supervivencia de sólo el 20% del número inicial de partículas virales, mientras que la inactivación completa se alcanzó con un tratamiento a 70 °C durante 5 min (Kiliç, 1996). Estudios previos demostraron que, en general, los fagos de *S. thermophilus* son más resistentes que los fagos de *Lb. helveticus* a los tratamientos térmicos (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000). Con respecto a bacterias lácticas mesófilas, algunos estudios realizados demostraron una gran resistencia térmica para los fagos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Estos fagos fueron capaces de sobrevivir a los tratamientos habituales de pasteurización usados en la industria láctea, y luego de una exposición de 7 min a 77,8 °C todavía fue posible detectar partículas viables (Nichols y Wolf, 1945; Zottola y Marth, 1996). Para fagos de *L. lactis* subsp. *cremoris*, Daoust y col. (1965) informaron que fueron suficientes tratamientos de 65 °C durante 1,25 a 3 min para producir su completa destrucción (reducciones de 3,5 a 4 órdenes logarítmicos). Estudios realizados sobre fagos argentinos de *L. lactis* (Suárez y Reinheimer, 2000) demostraron que los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados en fagos de *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999). Un calentamiento de 45 min a 63 °C no fue suficiente para inactivar completamente suspensiones de alto título de estos fagos, y sólo las suspensiones en leche de los fagos 046 y QF12 (de un total de cuatro fagos) fueron inactivadas a 72 °C luego de 45 y 5 min de incubación, respectivamente. El mismo efecto protector de la leche que se vio en nuestros fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, fue anteriormente observado para fagos

de bacterias lácticas mesófilas, como *L. lactis* (Fabrizio y col., 1999). Según estos autores, algunas características propias de la leche podrían ser las responsables de la elevada resistencia térmica observada en estos fagos, ya que se verificó incremento moderado de la termorresistencia cuando la leche descremada fue reemplazada por leche entera, lo que sugiere que los lípidos de la leche contribuyen en el aumento de la resistencia térmica, a través de la adsorción de éstos a la superficie de las partículas virales.

Todos los tratamientos térmicos usados en el presente trabajo son más intensos que aquellos aplicados en la industria láctea durante los procesos de pasteurización de la leche (63 °C, 30 min ó 72 °C, 15 seg). Esto nos está indicando que los fagos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, al igual que muchos otros bacteriofagos, no pueden ser completamente eliminados de la leche que será utilizada en las elaboraciones industriales por medio de la pasteurización. Esto permitiría que los fagos no inactivados se propaguen, e interfieran con el normal desarrollo de los fermentos (Everson, 1991), y sobre todo, está mostrando una muy probable vía primaria de entrada de los fagos a las plantas de elaboración.

Analizando las cinéticas de inactivación térmica a 63 °C, y considerando que cada población viral se inactiva en forma exponencial (reacción de primer orden), se llega a una ecuación que indica que la curva de supervivencia es la suma de dos componentes lineales. De esta manera, se construyeron curvas teóricas para los tratamientos subletales a 63 °C, las cuales tuvieron buena correlación con los datos experimentales. Analizando los parámetros obtenidos mediante estas ecuaciones, se pudo confirmar lo que se había demostrado a nivel experimental. Respecto de la influencia del medio de suspensión sobre la velocidad de inactivación térmica de las partículas virales, se observó que las constantes  $k_1$  y  $k_2$  (constantes relacionadas con la velocidad de inactivación de las partículas virales) obtenidas en LDR fueron siempre las más pequeñas para todos los fagos, lo que indica una menor velocidad de inactivación en este medio de suspensión, confirmando el efecto protector ejercido por este medio de suspensión sobre los fagos BYM, YAB y LL-H, aún cuando en el caso del fago  $Ib_3$  este efecto fue despreciable. El estudio de otros parámetros

( $\gamma$  y  $1 - \gamma$ , que representan a las fracciones de poblaciones fágicas inactivadas a distintas velocidades) permitió reafirmar los resultados obtenidos en lo referido a la mayor termorresistencia del fago  $Ib_3$ , así como también la escasa resistencia térmica del fago LL-H.

Se investigó la influencia de algunos agentes químicos usados comúnmente como biocidas, tanto en las industrias como en los laboratorios. El ácido peracético (0,15%) resultó ser muy efectivo, produciendo una inactivación veloz y completa de las partículas fágicas antes de los 5 min de tratamiento. El tratamiento con etanol (100, 50, 75 y 10%) no fue tan efectivo, aunque se vio que a una concentración de 100% se produjo una rápida inactivación de los fagos. Como ya fue destacado en el caso de los tratamientos térmicos, el fago  $Ib_3$  presentó mayor resistencia frente a todas las concentraciones de etanol. El fago YAB fue el que presentó la mayor sensibilidad ( $T_{99} < 2,0$  min con etanol al 100%), seguido por el fago BYM ( $T_{99} = 2,5$  min). Por otro lado, los efectos del etanol a concentraciones de 10 y 50% fueron escasos o nulos ( $T_{99} > 45$  min en todos los casos). A una concentración de 75%, el etanol presentó también pobres efectos sobre la viabilidad fágica ( $T_{99} \geq 7,4$  min), y tuvo aún menores efectos nocivos sobre el fago  $Ib_3$  ( $T_{99} > 45$  min). La capacidad del alcohol isopropílico como biocida fue realmente despreciable en todas las concentraciones ensayadas (10, 50 y 100%) ( $T_{99} > 45$  min en todos los casos), observándose una muy escasa pérdida de la viabilidad fágica luego de 45 min con isopropanol al 50 ó 100%. Los tratamientos realizados con hipoclorito de sodio mostraron una buena efectividad en el caso de los fagos BYM, YAB y LL-H, donde se logró la inactivación completa de las partículas virales con concentraciones de 400 ppm de cloro activo, para tiempos de entre 4 y 45 min ( $T_{99} \leq 2,2$  min). La resistencia del fago  $Ib_3$  hacia este biocida merece una atención especial. A concentraciones variables entre 100 y 400 ppm de cloro activo, donde el resto de los fagos analizados mostró gran sensibilidad, el fago  $Ib_3$  apenas fue afectado. Fueron necesarias concentraciones de 1200 y 1400 ppm de cloro activo para obtener la inactivación total de la suspensión fágica, luego de 45 y 15 min, respectivamente. Como podemos observar, el fago  $Ib_3$  demostró ser muy resistente tanto a los tratamientos térmicos como así

también a los distintos biocidas ensayados. Este comportamiento podría estar relacionado con el hecho de que este fago fue aislado repetidas veces a partir de muestras de yogur con problemas en la acidificación, provenientes de una misma planta industrial, lo que sugiere una capacidad de permanecer en el ambiente, aún bajo condiciones adversas. Sozzi y Maret (1975) reportaron que fueron necesarios más de 500 ppm de cloro activo para inactivar al fago I112 (lítico de *Lb. helveticus*). Los fagos autóctonos de *Lb. delbrueckii* estudiados en este trabajo, demostraron ser más resistentes frente a los biocidas estudiados que ciertos fagos autóctonos de *S. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), para los cuales se observó que poseen una marcada sensibilidad hacia estos agentes, ya que fueron suficientes 5 min de exposición en una solución de hipoclorito de sodio de 100 ppm de cloro activo, y en otra de ácido peracético 0,15%, para provocar la inactivación total de las suspensiones fágicas. Soluciones de etanol al 100% y 75% demostraron ser muy eficientes biocidas para estos fagos. Aunque para los fagos que se estudiaron en el presente trabajo el efecto del alcohol isopropílico fue despreciable, en el caso de los fagos de *S. thermophilus*, su efecto fue letal a las mismas concentraciones que las soluciones de etanol, excepto para los fagos 021-5 y CYM, los cuales fueron más resistentes en soluciones de isopropanol que en las de etanol (Binetti y Reinheimer, 2000). Los fagos de *S. thermophilus* estudiados por Binetti y Reinheimer (2002), resultaron poseer similar resistencia hacia este biocida que los fagos de *Lb. delbrueckii* estudiados aquí. Se necesitaron más de 500 ppm de cloro activo para inactivar fagos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Hunter, 1940; Bennet, 1954). Soluciones de etanol al 75% y 100% fueron eficientes a la hora de inactivar fagos autóctonos de lactococos (Suárez y Reinheimer, 2002). En cuanto al fago F116 (lítico de *Pseudomona aeruginosa* PAO1), los tratamientos realizados con 70 y 100% de etanol durante 30 min provocaron alteraciones en la cápside (Maillard, 1996a), aunque no se observaron efectos sobre el ADN viral, lo cual es lógico si se considera que el etanol es un reactivo comúnmente empleado en biología molecular para purificar el ácido nucleico extraído y sometido luego a análisis. El isopropanol al 100% también produjo alteraciones a

nivel de la cápside del fago F116 (Maillard, 1995b; Maillard, 1996a). El ácido peracético alteró el ácido nucleico de este fago, así como su estructura (Maillard, 1996a; Maillard 1996b), y a una concentración de 0,1% todavía se observó una reducción del 99,99% en el título fágico, luego de 10 min de incubación. A pesar de esto, no está muy claro si el biocida inactivó el ADN fágico en el interior de la cápside, o si lo hizo luego de la ruptura de la cubierta proteica, cuando fue liberado al medio, o si fue capaz de actuar de las dos formas (Maillard 1996a; Maillard 1996b).

Se obtuvieron los perfiles de restricción de los tres fagos autóctonos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, utilizando distintas endonucleasas, lo que permitió confirmar que se trata de tres fagos distintos. Sin embargo, se pudo observar que los fagos BYM y YAB poseen algunas bandas en común, y lo mismo ocurre entre los fagos YAB e *lb<sub>3</sub>*. También se calculó el tamaño del genoma de estos tres fagos, los cuales oscilaron entre 31 y 34 kb. El peso molecular del fago ch2 (lítico de *Lb. bulgaricus* CH2) se calculó en 35 kb (Chow y col., 1988). El fago LL-H, lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, posee un tamaño de genoma de 34,6 kb (Alatossava y col., 1998). Un valor similar (35 kb) fue calculado para el fago *lb539* (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 539) (Auaad y col., 1997).

Cuando se estudió la naturaleza de los sitios de empaquetamiento, no se observaron fragmentos submolares en el ADN no ligado del fago YAB (se observan las mismas bandas para el ADN ligado y sin ligar), por lo que se deduce que los extremos de su ADN no son cohesivos. Lo mismo puede decirse del fago BYM, aunque en este caso el perfil obtenido no tuvo la nitidez suficiente, pero su ADN aparentemente no presentaría extremos cohesivos. En el caso del fago *lb<sub>3</sub>*, se pudo observar que al ligar el ADN desaparecieron dos bandas (fracciones submolares de 1 y 2,9 kb), que aparecen como una banda de mayor peso molecular (de 4 kb), en el perfil ligado (correspondiente a la suma de los dos fragmentos submolares observados en el perfil no ligado). En un principio, se pensó que las moléculas de ADN del fago LL-H (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) eran circulares (con extremos cohesivos), pero esto fue refutado posteriormente mediante microscopía electrónica,

mediante la cual se observó que, por el contrario, el ADN de este fago poseía extremos constantes (*pac sites*) (Alatossava y col., 1998). El fago Ib539 (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 539) posee un ADN de cadena lineal. Estudios realizados con enzimas de restricción sugieren que el ADN del fago Ib539 posee extremos *pac* o constantes. (Auad y col., 1997).

Al estudiar los requerimientos para completar el ciclo lítico en medio líquido, se reveló una dependencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  para los fagos YAB e Ib<sub>3</sub>, así como también para el fago de colección LL-H. El fago BYM mostró un comportamiento distinto, ya que fue capaz de completar el ciclo lítico tanto en presencia como en ausencia de este catión, aunque en estas últimas condiciones la lisis se observó más tardíamente. En el caso del fago hv, lítico de *Lb. helveticus* ATCC 15807, se vio una independencia del  $\text{Ca}^{2+}$  para completar la lisis celular en medio líquido, aunque por otro lado, el fago ATCC 15807-B1 fue calcio-dependiente (Quiberoni y Reinheimer, 1998). En estudios realizados sobre fagos de *S. thermophilus*, se observó una independencia de este catión para observar la lisis en medio líquido, para los fagos CYM y OBJ (líticos de *S. thermophilus* YSD10 y *S. thermophilus* JB15 respectivamente). El fago CYM no requirió este ion para completar la lisis, aunque ésta se vio algo retrasada en ausencia del mismo, lo cual pudo relacionarse a que su cepa sensible desarrolla con mayor rapidez en presencia de calcio (Stiefel, 2000). Otro estudio realizado sobre cuatro fagos autóctonos de *S. thermophilus* (fagos 031, 021-4, 021-5 y 031-D) arrojó similares resultados, observándose lisis celular aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque ésta fue más rápida en presencia de este ion (Binetti y col., 2002).

La formación de placas de lisis en medio agarizado se vio afectada por la ausencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en los fagos autóctonos analizados (fagos YAB, BYM e Ib<sub>3</sub>). En estos casos sólo se observaron placas de lisis en Agar MRS-Ca, no evidenciándose en el medio agarizado sin el agregado de este catión. A diferencia de esto, en el caso del fago LL-H se observaron placas de lisis tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque el tamaño de las placas fue menor en ausencia del ion.



Las cinéticas de adsorción revelaron que estos fagos estudiados no dependen de la presencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  para llevar a cabo la primera etapa del ciclo lítico, y todos ellos mostraron una rápida adsorción a sus cepas sensibles. Relacionando estos resultados con los discutidos en párrafos anteriores, se deduce que el  $\text{Ca}^{2+}$  no es necesario para que se produzca la adsorción, pero sí es requerido en una etapa posterior del ciclo lítico. Esto mismo se demostró para el fago ATCC 15807-B1, lítico de *Lb. helveticus* ATCC 15807, que dependió de este ion para completar el ciclo lítico, aunque el fago hv, lítico de la misma cepa, exhibió independencia de su presencia (Quiberoni y Reinheimer, 1998). Otro estudio realizado (Binetti y col., 2002) también demostró que el  $\text{Ca}^{2+}$  no es necesario para que se produzca la adsorción de cuatro fagos autóctonos sobre sus cepas sensibles de *S. thermophilus*, aunque la lisis en medio líquido se vio retrasada, y no se observaron placas de lisis en ausencia del catión. El rol de los cationes inorgánicos es llamativo. Según algunos autores (Sechaud y col., 1988), la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (o  $\text{Mg}^{2+}$ ) no sólo estabiliza el ADN fágico en el interior de la cápside e incrementa la tasa de adsorción, sino que también regula la eficiencia de la penetración del ADN viral al interior de las células bacterianas. Otros autores han demostrado que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no fue necesaria en la adsorción y posterior lisis de *Lb. helveticus* CNRZ 892 por los fagos 0241 y 832-B1. De todas formas, la presencia de este ion produjo una lisis más temprana y rápida (Sechaud y col., 1989). Para algunos sistemas, como el compuesto por el fago PL-1, lítico de *Lb. casei* ATCC 27092, se demostró que el  $\text{Ca}^{2+}$  no fue requerido en la adsorción, pero fue indispensable en la etapa de inyección del ADN fágico (Watanabe y Takesue, 1972). Para una propagación eficiente del fago 0488 sobre la cepa sensible *Lb. lactis* CNRZ 326, también fue necesario el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de cultivo (Cluzel y col., 1987).

Respecto a la influencia de la temperatura sobre la adsorción fágica, nuestros datos mostraron que los fagos se adsorbieron sobre las células de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* incluso a 0 °C. Las tasas máximas se alcanzaron a 10 °C para los fagos YAB e Ib<sub>3</sub>, manteniéndose constantes y cercanas al 100% en todo el rango de temperatura

estudiado. En el caso del fago BYM se observó influencia de la temperatura entre 0 °C y 20 °C, mientras que entre 20 °C y 50 °C esta influencia no se evidenció. Los valores de adsorción observados para el fago de colección LL-H, fueron menores que aquellos obtenidos para los fagos autóctonos. En este caso, el valor mínimo de adsorción se obtuvo a 0 °C, y el máximo entre 37 °C y 45 °C. Estudios realizados sobre fagos de *S. thermophilus* (Binetti y col., 2002) revelaron que éstos adsorben a 0 °C, pero los valores más altos se dan en el rango de temperatura óptima de desarrollo de sus cepas sensibles. Watanabe y col. (1993) demostraron que la adsorción a 0 °C tuvo similares valores que a 37 °C para el fago PL-1 (específico de *Lb. casei*). Sin embargo, no se incrementó el número de partículas “fantasmas” durante la incubación a 0 °C, lo que sugiere que es necesario que las células bacterianas se encuentren activas para que se produzca la inyección del ADN fágico. Los fagos CYM y OBJ (líticos de *S. thermophilus*) tuvieron un comportamiento particular, ya que alcanzaron sus tasas máximas de adsorción a temperaturas inferiores que la óptima de sus cepas sensibles (30 °C y 20 °C respectivamente) (Stiefel, 2000).

En este trabajo no se observó una influencia significativa del estado fisiológico de las células bacterianas sobre la capacidad de adsorción de todos los fagos estudiados. Estos fagos se adsorbieron normalmente tanto a células viables como no viables (sometidas a 100 °C durante 10 min), lo que demuestra que los receptores fágicos son termoestables, y que el proceso de adsorción no depende del estado fisiológico celular. Otros trabajos publicados han obtenido similares resultados. Quiberoni y col. (1998) demostraron que los fagos hv y ATCC 15807-B1 se adsorbieron exitosamente a células no viables de *Lb. helveticus* ATCC 15807. Por otro lado, un estudio de microscopía electrónica reveló que el fago PL-1 se adsorbió normalmente sobre células de *Lb. casei* ATCC 27092 que habían sido sometidas a un tratamiento con agua en ebullición (Watanabe y col., 1993). Trabajos realizados con fagos de *S. thermophilus* también llegaron a idénticos resultados (Binetti y col., 2002). Para los fagos CYM y OBJ (virulentos de *S. thermophilus* YSD10 y BJ15, respectivamente) se

constató un comportamiento similar al hallado en otros sistemas, con una independencia respecto al estado fisiológico de las células (Stiefel, 2000).

El ciclo lítico de un bacteriofago se inicia cuando éste se adsorbe a la superficie celular, sobre estructuras conocidas como receptores, siendo éste un evento altamente específico. Para que se produzca una correcta unión fago-receptor, resulta indispensable que esta estructura se encuentre íntegra y que conserve una determinada conformación espacial. Luego de la adsorción, el ADN fágico es inyectado, y el metabolismo celular normal se detiene, se sintetizan nuevas partículas fágicas y son liberadas al medio (Neve, 1996).

Los estudios sobre receptores fágicos pueden llevarse a cabo tanto en células bacterianas enteras, o sobre paredes celulares purificadas. Estas pruebas involucran tratamientos químicos y enzimáticos, que pueden afectar o destruir componentes de la superficie celular. Si se utilizan células enteras, ciertas sustancias intracelulares podrían liberarse e interferir con los experimentos de inactivación. Por esta razón, se prefirió el uso de paredes celulares purificadas, y éstas fueron utilizadas para realizar los estudios de los receptores.

Las paredes celulares purificadas fueron tratadas química y enzimáticamente, y se realizaron ensayos de adsorción con las paredes en estas condiciones, a fin de identificar las estructuras celulares que están involucradas en la adsorción de los fagos. Los tratamientos con proteinasa K y SDS no produjeron cambios en la capacidad de adsorción de ninguno de los tres fagos autóctonos estudiados, así como tampoco en el caso del fago de colección Ib539 (lítico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326). El tratamiento con proteinasa K hidroliza las uniones peptídicas, y el SDS actúa removiendo y desnaturalizando proteínas de la pared, e incluso aquellas ancladas en la membrana celular. En consecuencia, se descartó la presencia de un componente de naturaleza proteica en estos receptores virales. A diferencia de estos resultados, se ha visto que la proteína S-layer es un componente esencial para que se produzca la adsorción del fago CNRZ 832-B1 sobre

células de *Lb. helveticus* CNRZ 892. En este caso, se pudo aislar y secuenciar el gen que codifica la producción de esta proteína, y se descubrió que la secuencia localizada en la región central de este gen era esencial para el proceso de adsorción y por otro lado, se han encontrado mutaciones puntuales localizadas en esa región genómica de los mutantes fagorresistentes aislados de la cepa sensible (Ventura y col., 1999).

El tratamiento con mutanolisina redujo de manera apreciable la adsorción de los fagos estudiados. Esta enzima hidroliza uniones glicosídicas, y actúa principalmente sobre componentes del peptidoglicano. Sin embargo, la mutanolisina posee una especificidad hidrolítica algo restringida, y no se puede descartar la posibilidad de que actúe también sobre los polisacáridos accesorios de pared, glicoproteínas, o residuos glicosídicos que están sobre los ácidos lipoteicoicos (Valyasevi y col., 1991). La disminución de la adsorción observada luego de realizar este tratamiento sobre las paredes, sugiere que la unión de los fagos a la superficie celular puede involucrar alguna de estas estructuras.

El peptidoglicano es el componente predominante de la pared celular de las bacterias Gram positivas, representando entre el 50% y 90% de su peso seco. Como consecuencia, el peptidoglicano está asociado frecuentemente con la estructura de receptores fágicos. Además, también se han encontrado otras estructuras unidas en forma covalente al peptidoglicano, o asociadas a la pared celular a través de uniones débiles. Específicamente, la gran variabilidad estructural y la gran accesibilidad de estos polímeros hicieron de éstos los componentes más frecuentemente identificados como receptores fágicos en bacterias Gram positivas (Lindberg, 1973).

El componente predominante de la pared celular en cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* E8 y 398 resultó ser un polisacárido accesorio formado por glucosa, galactosa, ramnosa y N-acetilglucosamina. Varios tratamientos químicos y enzimáticos demostraron que los polisacáridos de la pared celular, unidos covalentemente al peptidoglicano, estaban involucrados en la adsorción de tres pequeños fagos de *L. lactis* subsp. *cremoris* E8. (Gopal

y Reilly, 1995). Estos polisacáridos accesorios también estuvieron presentes en otras cepas de lactococos (Johnson y McDonald, 1974; Sijtsma y col., 1990).

El primer indicio de que los receptores fágicos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab<sub>1</sub>, Ib<sub>3</sub> e YSD V, y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 326 eran de naturaleza hidrocarbonada y no proteica fue el resultado del tratamiento con mutanolisina de las paredes celulares, donde se observó la disminución de la capacidad de adsorción de los fagos a sus cepas sensibles. Esta hipótesis fue confirmada luego de realizar ensayos de adsorción sobre paredes tratadas con TCA. Este agente extrae los polímeros asociados al peptidoglicano de la pared de bacterias Gram positivas (Gopal y Reilly, 1995). La disminución en los porcentajes de adsorción de los fagos a las paredes celulares tratadas con TCA 5% sugiere que los receptores podrían estar constituidos por complejos peptidoglicano - polisacáridos accesorios. El tratamiento con TCA 5% redujo de manera apreciable la habilidad de las células de *L. lactis* subsp. *cremoris* E8 para inactivar fagos (Gopal y Reilly, 1995).

Quiberoni y col. (2000) obtuvieron resultados similares cuando analizaron paredes celulares de dos cepas de *S. thermophilus*, donde se vio que la adsorción del fago CYM a paredes celulares de *S. thermophilus* YSD10 tratadas con TCA 5% disminuyó apreciablemente (49%). El efecto fue menos marcado para el fago OBJ, pero en este caso, la disminución fue notoria en células de *S. thermophilus* BJ10 tratadas con mutanolisina. En este último caso, se puede concluir que el receptor para el fago OBJ forma parte del peptidoglicano o de un polímero íntimamente relacionado a éste.

Se realizaron pruebas de inhibición de fagos con distintas soluciones de monosacáridos, los cuales fueron seleccionados por ser los que se encuentran habitualmente formando parte de la pared celular y, por lo tanto, podrían integrar los receptores fágicos. En el caso del fago YAB, no se observó una inhibición concluyente por parte de ninguno de los azúcares testeados, y sólo se obtuvo una cierta inhibición cuando se utilizó una solución de glucosa (25% de inhibición). Resultados similares pero mucho más

dispare se obtuvieron en el caso del fago Ib<sub>3</sub>, donde ninguno de los azúcares produjo una inhibición significativa, y lo mismo ocurrió cuando se trabajó con el fago BYM y el fago de colección Ib539. Al observar estos resultados, se decidió preparar todas las soluciones de monosacáridos en otro diluyente para descartar la influencia del medio de suspensión sobre los resultados obtenidos. Todas las soluciones habían sido preparadas en un primer momento en buffer Tris-HCl, y se prepararon nuevamente pero esta vez en agua bidestilada estéril, y se realizaron las mismas pruebas de inhibición con estas nuevas soluciones, pero no se observaron diferencias significativas con los resultados obtenidos anteriormente. Analizando estos hechos, podemos hacer varias hipótesis: la primera, que ninguno de los azúcares ensayados forme parte esencial de los receptores fágicos; y la segunda, y posiblemente más cercana a la realidad, es que el receptor esté formado por varios residuos de azúcares asociados, y para que sea posible observar la adsorción de la partícula viral sobre su receptor se necesite una cierta configuración espacial, o una mezcla adecuada de los monosacáridos. Conclusiones similares se obtuvieron en otro trabajo, donde se estudiaron los fagos hv y ATCC 15807-B1, ambos líticos de *Lb. helveticus* ATCC 15807 (Quiberoni y Reinheimer, 1998). Un estudio realizado sobre fagos de *S. thermophilus* sugiere que el fago 021-4 se adsorbe a un componente que posee residuos de ramnosa y ribosa. Asimismo, se observaron importantes niveles de inhibición cuando se incubó a los fagos 021-5, 031 y 031-D en soluciones de glucosamina y N-acetilglucosamina. Estos tres fagos son inhibidos por los mismos monosacáridos, lo que indica que todos ellos reconocen al mismo receptor, que se encuentra ubicado en la pared celular de células sensibles de *S. thermophilus* ST 12-5 (Binetti y col., 2002). Con respecto al fago CYM (lítico de *S. thermophilus* YSD10), se sugirió que éste se adsorbe a un componente que involucra residuos de glucosamina y ramnosa. Existe también una inhibición leve por parte de soluciones de glucosa, lo que indicaría que el sitio de adsorción incluye, o estaría influenciado por residuos de este monosacárido. La adsorción del fago 0BJ sobre su cepa sensible *S. thermophilus* BJ15, se vio interferida cuando se utilizaron soluciones de

glucosamina y ribosa (Quiberoni y col., 2000). De manera similar, se observó que el receptor para el fago kh, lítico de *Lb. lactis* subsp. *lactis* KH, podría estar compuesto por residuos de ramnosa, la cual forma parte del polisacárido de la pared celular, mientras que la galactosa podría formar parte esencial del componente estructural ubicado en las cercanías del receptor (Valyasevi y col., 1990).

El ciclo lítico comienza a partir de la adsorción de un fago a la superficie de una bacteria sensible. Normalmente, la adsorción consta de dos etapas, la primera, reversible, y la segunda irreversible. Luego de una primera unión reversible a la pared celular, el fago c2, lítico de *L. lactis* C2, se adsorbe en forma irreversible a una proteína ubicada en la membrana celular (Valyasevi y col., 1991).

Nuestro trabajo también reveló la irreversibilidad del proceso de adsorción para todos los fagos analizados (YAB, BYM, Ib<sub>3</sub> y Ib539), demostrando que este primer paso dentro del ciclo lítico se produjo de manera rápida y eficiente. Resultados similares se observaron para fagos de *S. thermophilus* (Quiberoni y col., 2000; Binetti y col., 2002), así como también para el fago kh de *L. lactis* subsp. *cremoris* KH (Valyasevi y col., 1994). En contraste, en el caso de siete fagos de *L. lactis* subsp. *lactis* C2 se demostró que la adsorción se produjo en forma reversible (Monteville y col., 1994).

# CONCLUSIONES

---



Como ya lo hemos mencionado a lo largo de todo este trabajo, los cultivos termófilos son ampliamente usados en la industria láctea fermentativa, siendo *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* uno de los microorganismos más utilizados (junto a *S. thermophilus*) en la elaboración de leches fermentadas. Asimismo, los bacteriofagos son la causa más importante de acidificaciones defectuosas en procesos lácteos fermentativos, por lo que resulta indispensable el estudio de la interacción fago-cepa sensible. De esta manera, es posible llevar a cabo medidas preventivas que impidan o retrasen las infecciones fágicas, evitando así grandes pérdidas económicas que el producto de elaboraciones defectuosas implicaría.

En el presente trabajo se investigaron los factores que influyen en la adsorción de los primeros tres fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (BYM, YAB e Ib<sub>3</sub>) aislados de plantas argentinas de yogur; y de dos fagos de colección, LL-H y Ib539, ambos líticos de cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. También se estudió la naturaleza de los receptores de sus cepas sensibles.

Nuestros hallazgos revelaron diversidad por parte de los fagos en cuanto a su resistencia térmica y química. En general, estos fagos no fueron inactivados completamente a las temperaturas habituales de pasteurización de la leche, evidenciándose una clara influencia del medio de suspensión utilizado, siendo mayor la termorresistencia cuando se los suspendió en leche, y menor cuando lo fueron en caldo MRS. El ácido peracético fue el agente biocida más efectivo, siendo suficientes 5 min de exposición para inactivar las suspensiones fágicas. En general, los fagos fueron inactivados con concentraciones de 400 ppm de hipoclorito de sodio, excepto el fago Ib<sub>3</sub>, para el cual fueron necesarias 1400 ppm. Los alcoholes (etílico e isopropílico) no fueron efectivos como biocidas. Los estudios preliminares a nivel molecular, demostraron que los tres fagos autóctonos son diferentes, aún cuando comparten algunas pequeñas semejanzas a nivel de fragmentos de restricción. Los genomas son similares en tamaño a los reportados para otros fagos específicos de la especie, y el estudio de los sitios de empaquetamiento evidenció la presencia de sitios cos

para el fago Ib<sub>3</sub>, y sitios *pac* para BYM y YAB. Estudios adicionales, que actualmente se llevan a cabo en el I.P.L.A. (España), permitirán compararlos con otros fagos líticos de la especie. Todos los fagos estudiados necesitaron del ion Ca<sup>2+</sup> para completar la lisis en medio líquido, excepto el fago BYM, para el cual se observó pero en forma más lenta que con el agregado de este catión. Este ion también fue indispensable a la hora de observar placas de lisis en medio agarizado, exceptuando el caso del fago de colección LL-H, en donde se visualizaron tanto en ausencia como en presencia de Ca<sup>2+</sup>.

La adsorción se llevó a cabo de manera normal en ausencia de Ca<sup>2+</sup> en todos los casos, por lo que deducimos que este ion no es necesario en la primera etapa del ciclo infectivo, pero sí en algún de los paso posterior, para algunos de los fagos estudiados. Las tasas máximas de adsorción se observaron en el rango de temperatura 0-50 °C para la mayoría de los fagos, excepto para el fago BYM, cuya adsorción se reveló disminuida a 0 °C y 10 °C. También fue posible deducir que el proceso de adsorción no necesita de células vivas para que se produzca, ya que las tasas de adsorción fueron las mismas en células viables como en no viables. De aquí es posible obtener un dato adicional acerca de los receptores, ya que para obtener las células no viables, éstas fueron sometidas a un tratamiento térmico importante, lo cual no modificó la capacidad de unión de los fagos a sus receptores. Mediante otros estudios, se observó que en todos los casos, los receptores serían de naturaleza hidrocarbonada y no proteica. Ninguno de los monosacáridos utilizados produjo una inhibición clara de la adsorción fágica, por lo que tendemos a pensar que los receptores están compuestos por residuos de varios azúcares asociados. Por último, se observó que el proceso de adsorción resultó ser irreversible en todos los casos estudiados.

El presente estudio informa sobre los primeros aislamientos de fagos argentinos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, revelando las principales características de la interacción célula bacteriana/ fago para esta especie. Esto se constituye en una valiosa contribución al conocimiento científico que se tiene sobre la infección fágica a cultivos lácticos termófilos, de enorme importancia tecnológica en nuestro país.

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Accolas, J-P. and Spillman, H. Morphology of Bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis* and *L. helveticus*. Journal of Applied Bacteriology. 47: 309-319 (1979).
2. Ackermann, H.W.; Cantor, E.D.; Jarvis, A.W.; Lembke, J. and Mayo, J.A. New species definitions in phages of gram positive cocci. Intervirology. 22: 181-190 (1984).
3. Ackermann, H.W.; Cantor, E.D.; Jarvis, A.W.; Lembke, J. and Mayo, J.A. New species definitions in phages of Gram positive cocci. Intervirology. 22: 181-190 (1984).
4. Aguirre, Collins. Lactic acid bacteria and human clinical infection. A Review Journal of Applied Bacteriology. 75: 95-107 (1994).
5. Alatossava, T. and Pyhtilä, M.J. IRCS Medical Science. 8, 297 (1980).
6. Alatossava, T.; Forsman, P.; Mikkonen, M.; Räisänen, L. and Vasala, A. Molecular genetics and evolution of *Lactobacillus* phage and its related phages. Recent Res. Devel. In Agricultural & Biological Chem. 2: 345-359 (1998).
7. Alatossava, T.; Jütte, H. and Seiler, H. Transmembrane cation movements during infection of *Lactobacillus lactis* by bacteriophage LL-H. Journal of General Virology. 1525-1532 (1987).
8. Alatossava, T.; Juvonen, T. and Huhtinen R-L. Effect of cadmiun on the infection of *Lactobacillus lactis* by bacteriophage LL-H. Journal of General Virology. 64: 1623 (1983).
9. Auad, L. Lisogenia de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: estudio y caracterización de sus bacteriofagos temperados. Tesis presentada como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Doctor en Bioquímica. Fac. de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. (1998).
10. Auad, L.; Ruiz Holgado, A.A.P.; Forsman, P.; Alatossava, T. and Raya, R.R. Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* temperate bacteriophage. Journal of Dairy Science. 80(11): 2706-2712 (1997).
11. Auclair, J. and Accolas, J. Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. Antoine Van Leeunanhock. 49: 313-326 (1983).

12. Axelsson. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. Cap. 1. In Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Ed. by S. Salmine and V. von Wright. 2° Ed (1998).
13. Bennet, F.; Nelson, F. Action of certain viricidal agents on lactic *Streptococcus* bacteriophage in liquids. Journal of Dairy Research (1954).
14. Beveridge, T.J. and all. V. Functions of S-layers. FEMS Microbiology Reviews. 20: 99-149 (1997).
15. Binetti, A.G. and Reinheimer, J.A. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. Journal of Food Protection. 63(4): 509-515 (2000).
16. Binetti, A.G. 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. (2001).
17. Binetti, A.G.; Quiberoni, A.; Reinheimer, J.A. Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. Food Research International. 35: 73-83 (2002).
18. Birge, E.A. T<sub>4</sub> bacteriophage as a model genetic system. Cap. 6 in Bacterial and bacteriophage genetics. Springer-Verlag New York, Inc. (1994).
19. Bolondi, A.; Gaggino, O. y Monesiglio, J.C. Microscopía electrónica. Técnicas generales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria ed. (1995).
20. Bottazzi, V.; Bianchi, F. I microorganismi lattiero-caseari al microscopio elettronico a scansione. EdiErmes s.r.l. Milano (1984).
21. Bradley, D.E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriological Reviews. 31: 230-314 (1967).
22. Brock, T.D. and Madigan, M.T. Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana. 6° Ed. (1991).
23. Brüssow, H. and Bruttin, A. Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. Virology 212: 632-640 (1995).

24. Brüssow, H.; Bruttin, A.; Desiere, F.; Luccini, S. and Foley, S. Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. A Review. *Virus Genes* 16(1): 95-109 (1998).
25. Brüssow, H.; Frémont, M.; Bruttin, A.; Sidoti, J.; Constable, A. and Fryder, V. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12): 4537-4543 (1994).
26. Bruttin, A.; Desiere, F.; D'Amico, N. Guérin, J-P.; Sidoti, J.; Huni, B.; Luccini, S. and Brüssow, H. Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8): 3144-3150 (1997).
27. Callegari, M.L. Caratterizzazione dei recettori de pare specifici per l'adesione dei batteri lattici termofili. Tesis presentada para obtener el título de Dottore di Ricerca della Università Católica del Sacro Cuore. Piacenza. Italia (1992).
28. Callegari, M.L.; Riboli, B.; Sanders, J.W.; Cocconcelli, P.S.; Kok, J.; Venema, G. and Morelli, L. The layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression. *Microbiology*. 144: 719-726 (1998).
29. Cerning, J.; Bouillane, C.; Desmazeaud, M.J. and London, M. Isolation and characterization of exocellular exopolysaccharide produced by *Lb. bulgaricus*. *Biotechnology Letters*. Vol. 8, N° 9, 625-628 (1986).
30. Chow, J.J.; Batt, C.A. and Sinskey, A.J. Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Applied and Environmental Microbiology* 54(5): 1138-1142 (1988).
31. Cluzel, P.J.; Veaux, M.; Rousseau, M. and Accolas, J.P. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Research*. 54: 397-405 (1987).
32. Cluzel, P-J.; Serio, J. and Accolas, J-P. Interactions of *Lactobacillus bulgaricus* temperate bacteriophage 0448 with host strains. *Applied and Environmental Microbiology* (1987).

33. Coffey, A.; Coakley, M.; McGarry, A.; Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. Increasing phage resistance of cheese starters: a case study using *Lactococcus lactis* DPC4268. *Applied Microbiology*. 26: 51-55 (1998).
34. Cogan, T.M. History and Taxonomy of starter cultures. Cap. 1 in *Dairy Starter Cultures*. Ed. by Cogan and Accolas, J.P. (1996).
35. Craig, J.; Oberg, C.J. and Broadbent, J.R. Thermophilic starter cultures. Another set of problems. *Journal of Dairy Science*. 76: 2392-2406 (1993).
36. Crick, F.H.C. Virus structure: general principles. p5-18 In G.E.W .Wolstenholme and E.C.P. Millar ed. *The nature of viruses*. Churchill. London. (1957).
37. Crick, F.H.C. and Watson, J.D. Structure of small viruses. *Nature*. 177: 473-475 (1956).
38. Daoust, D.R.; El-Bisi, H.M. and Litsky, W. Thermal destruction kinetics of lactic streptococcal bacteriophage. *Applied Microbiology*. 13: 478-485 (1965).
39. De los Reyes Gavilán, C. G; Limsowtin, G.K.; Sechaud, L.; Veaux, M. and Accolas, J-P. Evidence for a Plasmid-Linked Restriction-Modification System in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 3412-3419 (1990).
40. Deane, E.; Nelson, F.E.; Ryser, F.C. and Carr, P.H. *Streptococcus thermophilus* bacteriophage from Swiss cheese whey. *Journal of Dairy Science*. 36: 185-196 (1953).
41. Desmazeaud, M. Growth Inhibition of Lactic Acid Bacteria. Cap. 5 in *Dairy Starter Cultures*. Ed. by Cogan, T.M. and Accolas, J.P. VCH Publishers, Inc. 135-155 (1996).
42. Djordjevic, G.M.; O'Sullivan, D.J.; Walker, S.A.; Conkling, M.A. and Klaenhammer, T.R. A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *Journal of Bacteriology* 179(21): 6741-6748 (1997).
43. Driessen, F.M.; Kingma, F. and Stadhouders, J. Evidence that *Lb. bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *S. thermophilus*. *Neth. Milk Dairy Journal* (1982).

44. Earnshaw, R.G. The Antimicrobial Action of Lactic Acid Bacteria. Natural Food Preservation Systems. Cap. 9 in The Lactic Acid Bacteria. Vol. I: The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. Ed. by Wood, B.J.B. Elsevier Applied Science. 211-225 (1992).
45. Everson, T. Control of phage in the dairy plant. In Bulletin FIL-IDF N° 263. Cap. 3 (1991).
46. Fabrizio, S.V.; Ledford, R.A. and Parada, J.L. Heat resistance of *Lactococcus lactis* bacteriophages. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 17: 191-198 (1999).
47. Forde, A. and Fitzgerald, G.F. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 76: 89-113 (1999).
48. Foschino, R.; Perrone, F. and Galli, A. Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. Journal of Applied Bacteriology. 79: 677-683 (1995).
49. Frank and Hassan. Starter Cultures and Their Use. Cap. 6 in Applied Dairy Microbiology. Ed. by Marth, E.H. and Steele, J.L. Marcel Dekker, Inc. (1998).
50. García-Garibay, M.; Marshall, V.M.E. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Journal of Applied Bacteriology. 70: 325 (1991).
51. Garnot, P.; Molk, D. Heat stability of milk-dotting enzymes in conditions encountered in Swiss-cheese making. Journal of Food Science. 52: 75-87 (1987).
52. Garvey, P.; van Sinderen, D.; Twomey, D.P.; Hill, C. and Fitzgerald, G.F. Molecular Genetics of Bacteriophage and Natural Phage Defence Systems in the Genus *Lactococcus*. Int. Dairy Journal 5: 905-947 (1995).
53. Garvey, P.A.; Fitzgerald, G.F. & Hill, C. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. Applied and Environmental Microbiology. 61: 4321-4328 (1995).
54. Garvey, P.A.; Hill, C. & Fitzgerald, G.F. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. Applied and Environmental Microbiology. 62: 676-679 (1996).



55. Gopal, P.K. and Reilly, K.I. Molecular architecture of the lactococcal cell surface as it relates to important industrial properties. *International Dairy Journal*. 5: 1095-1111 (1995).
56. Grobber, G.J.; Sikkema, J.; Smith, M.R. and de Bart, J.A.M. Production of exocellular polysaccharides by *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Bacteriology*. 79: 103-107 (1995).
57. Hassan, A.N.; Frank, J.K.; Schmidt, K.A.; Shalabi, S.I. Rheological properties of yogur made using encapsulated nonropy lactic cultures. *Journal of Dairy Science*. 78: 2091 (1996).
58. Hill, C. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiology Reviews*. 12: 87-108 (1993).
59. Hunter, G.J.E. and Whitehead, H.R. The action of chemical disinfectants on bacteriophages for the lactic streptococci. *Journal of Dairy Research*. 11: 62-66 (1940).
60. Ishibashi, K.; Takesue, S.; Watanabe, K. and Oishi, K. Use of lectins to characterize the receptor sites for bacteriophage PL-1 of *Lactobacillus casei*. *Journal of General Microbiology*. 128: 2251-2259 (1982).
61. Jacob, F.; Lwoff, A.; Siminovitch, A. and Wollman, E. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*. 84: 222-224 (1953).
62. Jarvis, A. Bacteriophages of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 72: 3406-3428 (1989).
63. Johnson, K.H. & Mc Donald, Y.J. Peptidoglycan structure in cell walls of parental and filamentous *Streptococcus cremoris* HP. *Can. Journal of Microbiology*. 20: 905-913 (1974).
64. Jonhson, K.H. & McDonald, Y.J. Peptidoglycan structure in cell walls of parental and filamentous *Streptococcus cremoris* HP. *Can. J. of Microbiology*. 20: 905-913 (1974).
65. Josephsen, J.; Neve, H. Bacteriophages and Lactic Acid Bacteria. Cap. 14. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects. Ed. by S. Salmine and von Wright. 2° Ed. (1998).

66. Keogh, B.P. and Pettingill, G. Adsorption of bacteriophage eb7 on *Streptococcus cremoris* EB7. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1946-1948 (1983).
67. Kiliç, A.O.; Pavlova, S.I.; Ma, W-G. and Tao, L. Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(6): 2111-2116 (1996).
68. Kim, J.H. and Batt, C.A. Molecular characteristics of a *Lactococcus lactis* bacteriophage F4-1. *Food Microbiology*. 8: 15-26 (1991).
69. Klaenhammer, T.R. and Fitzgerald, G.F. Bacteriophages and bacteriophage resistance. Cap. 3 in *Genetics of Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Gasson and de Vos ed. 106-158 (1994).
70. Klaenhammer, T.R. Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. *Advances in Applied Microbiology*. 30: 1-29 (1984).
71. Klaenhammer, T.R.; Sing, W.D. & Hill, C.J. Phage defense rotation strategy. Patents AU8356291, AU664537, CA2050533, EPO474463, US5593885 (1997).
72. Larbi, D.; Decaris, B. and Simonet, J.M. Different bacteriophage resistance mechanisms in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Journal of Dairy Research*. 59: 349-357 (1992).
73. Lerayer, A.L.S.; van Dender, A.G.F.; Moreno, I.; Mori, E.E.M. & Parada, J.L. Evaluation of a Phage-inhibitory medium for *Lactococcus* Starters in Pilot Cheese Manufacture. *Int. Dairy Journal*. 6: 529-535 (1996).
74. Lindberg, A.A. Bacteriophage receptors. *Annual Reviews Microbiology*. 27: 205-241 (1973).
75. Lodics, T.A. and Stensson, L.R. Characterization of bacteriophages and bacteria indigenous to a mixed-strain cheese starter. *Journal of Dairy Science*. 73: 2685-2696 (1990).
76. Lortal, S. Crystalline surface-layers of the genus *Lactobacillus*. Chapter 6. *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers*. Ed. by T.J. Beveridge and S.F. Koval. Plenum Press, New York (1993).

77. Luccini, S.; Desiere, F. And Brüsow, H. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a molecular evolution theory. *Journal of Virology*. 73(10): 8647-8656 (1999).
78. Maillard, J.-Y. Damage to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteriophage F116 DNA by biocides. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 540-544 (1996a).
79. Maillard, J.-Y. Effects of biocides on the transduction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by F116 bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology* 21: 215-218 (1995a).
80. Maillard, J.-Y. Electronmicroscopic investigation of the effects of biocides on *Pseudomonas aeruginosa* PAO bacteriophage F116. *Journal of Med. Microbiology*. Vol. 42: 415-420 (1995b).
81. Maillard, J.-Y. The effect of biocides on proteins of *Pseudomonas aeruginosa* PAO bacteriophage F116. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 291-295 (1996b).
82. Maillard, J.-Y.; Ham, A.C.; Baubet, V. and Perrin, R. Efficacy and mechanisms of action of sodium hypochlorite on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 phage F116. *Journal of Applied Microbiology* 85: 925-932 (1998).
83. Mäyrä- Mäkinen, A. and Bigret, M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. Cap. 2 in *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*. Ed. by Salmine and V. von Wright. 73- 102 (1998).
84. McGrath, S.; van Sinderen, D.; Fitzgerald, G.F. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. Review. *International Dairy Journal*. 12: 3-15 (2002).
85. Moineau, S. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 377-382 (1999).
86. Moineau, S.; Durmaz, E.D.; Pandian, S. and Klaenhammer, T.R. Use of monoclonal antibodies to investigate mechanisms of phage abortion in *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*. 75: 113 (1992).
87. Monteville, M.; Ardestami, B. and Geller, B. Lactococcal bacteriophages require a host wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(9): 3204-3211 (1994).

88. Morata de Ambrosini, V.; González, S.; Pesce de Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. Study of the morphology of the cell walls of some strains of lactic acid bacteria and related species. *Journal of Food Protection*. 61(5): 557-562 (1998).
89. Morelli, L.; Callegari, M.L. Surface layer of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. En V. Functions of S- layers (1997).
90. Naidu, A.S.; Bidlack, W.R. and Cleman, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38(1): 13-126 (1999).
91. Neve, H. and Teuber, M. Basic microbiology and molecular biology of bacteriophage of lactic acid bacteria in dairies. In Bulletin FIL-IDF N° 263. Cap. 1 (1991).
92. Neve, H. Bacteriophage. Cap. 6. Dairy Starter Cultures. Ed. by T.M. Cogan and J.P. Accolas. VCH Publishers, Inc. 157-190. (1996).
93. Neve, H.; Krush, U. and Teuber, M. Virulent and temperate bacteriophages of thermophilic lactic acid streptococci. *FEMS Microbiology Review*. 87: 58 (1990).
94. Neviani, E. Il siero-innesto. *L'industria del Latte* 29: 69-72 (1993).
95. Nichols, A.A. and Wolf, J.Z. The heat resistance of the bacteriophages of cheese starter with observations on the estimation of phage concentration. *Journal of Dairy Science*. 75: 905-913 (1945).
96. Nielsen, E.W. Long term use of a cheddar starter and development of phages with homology to its bacteria. *International Dairy Journal*. 8: 1003-1009 (1998).
97. Oberg, C.J. and Broadbent, J.R. Thermophilic Starter Cultures. Another Set of Problems. *Journal of Dairy Science*. 76: 2392-2406 (1992).
98. Ono, J.; Goto, T. and Okonogi, S. Metabolism and Propagation Rates in Lactic Acid Bacteria. Cap. 8. In Functions of Fermented Milk. Ed. by Nakazawa and Hosono. Elsevier Applied Science Publishers (1992).
99. Oram, J.D. and Reiter, B. The adsorption of phage to group N streptococci. The specificity of adsorption and the location of phage receptor substances in cell-wall and plasma membrane fractions. *Journal of General Virology*. 3: 103-109 (1968).

100. Oram, J.D. Isolation and properties of a phage receptor substance from the plasma membrane of *Streptococcus lactis* ML3. *Journal of General Virology*. 13: 59-71 (1971).
101. Ottogalli, G. and Galli, A. Recherche sulla microflora dei latte-innesti per formaggi molli del tipo "Crescenza". *Annali di Microbiologia* 17: 191-197 (1967).
102. Ouwehand, A.C. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. Cap. 5 in *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*. Ed. by Salmine and V. von Wright (1998).
103. Peitersen, N.; Sellars, R.L. and Cogan, T.M. Starter Systems. Cap. 2 in *Bulletin FIL-IDF N° 263* (1991).
104. Quiberoni, A. and Reinheimer, J.A. Physicochemical characterization of phage adsorption to *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 cells. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 762-768 (1998).
105. Quiberoni, A.; Reinheimer, J.A. Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage-resistance mutants in hard cheese production. *International Dairy Journal*. 8: 941-949 (1999).
106. Quiberoni, A.; Reinheimer, J.A. y Suárez, V.B. Bacteriofagos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* aislados de elaboraciones queseras defectuosas. Caracterización preliminar. I Encuentro Bromatológico Latinoamericano. (1996).
107. Quiberoni, A.; Stiefel, J.I., Reinheimer, J.A. Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cells obtained by a simple protocol. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 1059-1065 (2000).
108. Quiberoni, A.L. Interacción de bacterias lácticas termófilas con bacteriofagos específicos. Tesis presentada para acceder al título de Doctor en Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral (1997).
109. Quiberoni, A; Suárez, V.B. and Reinheimer, J.A. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *Journal of Food Protection*. 62 (8): 894-898 (1999).

110. Rajagopal, S.N. and Sandine, W.E. Isolation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophages from Italian cheese whey. *Cultured Dairy Products Journal*. 24: 18-21 (1989).
111. Ranhand, J.M. Simple, inexpensive procedure for the disruption of bacteria. *Applied Microbiology*. 28: 66-69 (1974).
112. Reinbold, G.W. and Reddy, M.S. Bacteriophage of *Streptococcus thermophilus*. *Dairy Industries*. 9: 413-416 (1973).
113. Reinheimer, J.A. Las bacterias lácticas. *Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos*. Edit. por CERIDE. Santa Fe, Argentina (1994).
114. Reinheimer, J.A.; Binetti, A.G.; Quiberoni, A.; Bailo, N.B.; Rubiolo, A. and Girafa, G. Natural milk cultures for the production of Argentinian cheeses. *Journal of Food Protection* 60 (1): 59-63 (1997).
115. Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A.G. and Suárez, V.B. The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard-cheese production. *International Dairy Journal*. 6: 869-879 (1996).
116. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 1, 2, 3. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
117. Sandine, W.E. Commercial Production of Dairy Starter Cultures. Cap. 7 in *Dairy Starter Cultures*. Ed. by Cogan, T.M. and Accolas, J.-P. 191-206 (1995).
118. Schäfer, A.; Geis, A.; Neve, H. and Teuber, M. Bacteriophage receptors in *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* F7 /2 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2-1. *FEMS Microbiology Letters*. 78: 69-74 (1991).
119. Schellhaass, S.M. and Morris, H.A. Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Microstructure*. 4: 279-287 (1985).
120. Schröder, W.D. Peracetic acid. *Brauwelt International* 1: 115-120 (1984).

121. Sechaud, L.; Callegari, M.L.; Rousseau, M.; Muller, M.C. and Accolas, J.P. Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent bacteriophage 832-B1 of *Lactobacillus helveticus* (1989).
122. Sechaud, L.; Cluzel, P.; Rousseau, M. Baumgarther; A. and Accolas, J.P. Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie*. 70: 401-410 (1988).
123. Sechaud, L.; Rousseau, M.; Fayard, B.; Callegari, M.L.; Quénée, P. and Accolas, J.P. Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: morphology and host range. *Applied and Environmental Microbiology*. 1011-1018 (1992).
124. Shieh, Y.S.C.; Ledford, R.A.; Dunny, G.M. and Liboff, M. Ultrastructure and lytic activity of bacteriophages isolated from cheese wheys. *Journal of Dairy Science*. 75: 1394-1401 (1992).
125. Shimizu-Kadota, M. and Tsuchida, N. Physical mapping of the virion and the prophage DNAs of a temperate *Lactobacillus* phage  $\phi$ FSW. *Journal of General Microbiology*. 130: 423-430 (1984).
126. Shimizu-Kadota, M.; Sakurai, T. and Tsuchida, N. Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 669-674 (1983).
127. Sijtsma, L.; Wouters, J.T.M. and Hellingwer, K.J. Isolation and characterization of lipoteichoic acid; a cell envelope component involved in preventing phage adsorption from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110. *Journal of Bacteriology*. 172(12): 7126-7130 (1990).
128. Sing, W.D. and Klaenhammer, T.R. A strategy for rotation of different bacteriophage defenses in a lactococcal single-strain starter culture system. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(2): 365-372 (1993).
129. Sleytr, U.B.; Messner, P.; Pum, D. and Sára, M. Crystalline bacterial cell surface layers: general principles and application potential. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*. 74: 215-325 (1993).

130. Sozzi, T. and Maret, R. Isolement et quelques caractéristiques des bactériophages de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus helveticus* de ferments d'Emmental lait. 545: 269-278 (1975).
131. Stent, G.S. y Calendar, R. Genética molecular. Freeman, W.H. and Company. Cap. 6, 10 y 13 (1978).
132. Stiefel, J.I. Caracterización del Proceso de Adsorción de Fagos a Bacterias Lácticas Termófilas. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Magíster en Ciencia de Alimentos (2000).
133. Suárez, V.B. y Reinheimer, J.A. Inactivación térmica y química de fagos autóctonos de *Lactococcus* spp. VI. Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos. 20-24 Noviembre 2000, Buenos Aires, Argentina (2000).
134. Suárez, V.B.; Quiberoni, A.; Binetti, A.G. y Reinheimer, J.A. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from argentinian dairy industries. Journal of Food Protection 65(10): 1597-1604 (2002).
135. Tamine. Modern cheese making hard cheeses. In Modern dairy technology. R.K. Robinson ed. Elsevier Applied Science. London. Vol II. (1993).
136. Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology. 29: 807-813 (1975).
137. Valyasevi, R.; Sandine, W.E. and Geller, B.L. A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. Journal of Bacteriology. 173: 6095-6100 (1991).
138. Valyasevi, R.; Sandine, W.E. and Geller, B.L. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 bacteriophage sk1 receptor involving rhamnose and glucose moieties in the cell wall. Journal of Dairy Science. 77: 1-6 (1994).
139. Valyasevi, R.; Sandine, W.E. and Geller, B.L. The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of extracellular wall polysaccharide. Applied and Environmental Microbiology. 56(6): 1882-1889 (1990).



- 
140. Varnan, A.H. and Sutherland, J.P. Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Acribia ed. (1994).
  141. Ventura, M.; Callegari, M.L. and Morelli, L. Surface layer variations affecting phage adsorption on seven *Lactobacillus helveticus* strains. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 49: 45-53 (1999).
  142. Watanabe, K. and Takesue, S. The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *J. gen. Virol.* 17: 19-30 (1972).
  143. Watanabe, K.; Ishibachi, K.; Nakashima, Y. and Sakurai, T. A phage resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *Journal of General Virology*. 65: 981-986 (1984).
  144. Watanabe, K.; Kakita, Y.; Nakashima, Y. and Miake, F. Involvement of host cell energy in the transfection of *Lactobacillus casei* protoplasts with phage PL-1 DNA. *Current Microbiology*. 32: 39-43(1995).
  145. Watanabe, K.; Shirabe, M.; Fukuzaki, T.; Kakita, Y.; Nakashima, Y. and Miake, F. Electron microscope studies on the host cell energy requirement for injection of PL-1 phage DNA into *Lactobacillus casei*. *Current Microbiology*. 26: 293-298 (1993).
  146. Williams, J.G.K.; Kubelkar, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535 (1990).
  147. Zottola, E.A. and Marth, E.H. Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*. 11: 1338-1342 (1996).

# ANEXO

---

## ANEXO

## MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS. FORMULACIONES.

## 1. Medios de cultivo

× Caldo MRS: se utilizó una versión comercial (Biokar Diagnostics, Beauvis, France), pH= 6,4 ± 0,1.

Composición	g/ l
Tripteína	10,0
Extracto de levadura	5,0
Extracto de carne	10,0
Glucosa	20,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Tween 80	1,08

× Agar MRS: caldo MRS adicionado de 12 g/l de agar bacteriológico.

× Agua de Peptona (0,1%): Disolver 1 g de peptona de caseína en 1 litro de agua destilada. Repartir 9 ml en tubos.

Estos medios fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min.

× Leche descremada reconstituida (LDR): leche descremada en polvo, al 10% en agua destilada. Se esterilizó a 110 °C durante 30 min.

## 2- Reactivos de uso general

✗ Solución de NaOH N/9 (solución Dornic): se pesaron 4,4445 g de hidróxido de sodio ( $P_{eq} = 40$ ) y se disolvieron en agua destilada, enrasando en un matraz de 1 litro de capacidad. Se determinó su concentración exacta mediante titulación de la base con biftalato de potasio.

✗ Biftalato de potasio: para titular la solución Dornic, se pesaron 0,4538 g del reactivo seco ( $P_{eq} = 204,3$ ), se disolvieron en agua destilada, calentando suavemente, se agregaron unas gotas de fenoftaleína y se tituló con la solución de NaOH preparada, hasta el viraje al rosado del color del indicador. Esta operación se realizó por triplicado.

✗ Solución de cloruro de calcio (1 M): se pesaron 110,986 g de cloruro de calcio y se completó a 1 litro con agua bidestilada. Se esterilizó por filtración (Filtros MILLIPORE, tipo HA, 0,45  $\mu\text{m}$ ).

## 3- Reactivos utilizados en la obtención y tratamiento de paredes celulares

### 3.1- Enzimas

Se prepararon soluciones madres (Sambrook y col., 1989) a partir de las enzimas liofilizadas comerciales, las cuales se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , constituyendo un stock.

- DNAsa (Sigma). Solución madre: 10 mg/ ml en agua bidestilada estéril.
- RNAsa (Sigma). Solución madre: 100 mg/ ml en agua bidestilada estéril.
- Mutanolisina (Sigma). Solución madre: 5000 U/ ml en agua bidestilada estéril.
- Proteinasa K (Sigma). Solución madre: 10 mg/ ml en agua bidestilada estéril.

### 3.2- Soluciones (Sambrook y col., 1989).

□ Solución de fosfato monoácido de potasio (1 M): se pesaron 17,4 g de fosfato monoácido de potasio, y se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada. Se esterilizó en autoclave 20 min a vapor fluente.

□ Solución de fosfato diácido de potasio (1 M): se pesaron 13,6 g de fosfato diácido de potasio y se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada. Se esterilizó en autoclave 20 min a vapor fluente.

□ Acido tricloroacético (TCA): se preparó una solución al 5% a partir de TCA de mayor concentración (100%).

□ SDS: se preparó una solución al 1% a partir de SDS de una concentración mayor (40%).

### 3.3- Soluciones buffer (Sambrook y col.; Sigma).

□ Fosfato (pH= 6,8; 100 mM): se mezclaron 4,97 ml de fosfato monoácido de potasio 1 M con 5,03 ml de fosfato diácido de potasio 10 M; completándose con 90 ml de agua bidestilada estéril.

□ Tris base (1 M): se pesaron 13,6 g de Tris base y se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Se esterilizó a 121 °C durante 15 min.

□ Tris-HCl (1 M): se pesaron 15,76 g de Tris-HCl y se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Se esterilizó a 121 °C durante 15 min.

□ Tris-HCl (100 mM, pH= 7,5): se mezclaron 1,6 ml de Tris base (1 M) con 8,4 ml de Tris-HCl (1 M) y se completaron con 90 ml de agua destilada. Se esterilizó a 121 °C durante 15 min.

□ Tris-HCl (50 mM; pH= 7,5 a 25 °C): se realizó una dilución al ½ de la solución de Tris-HCl (100 mM, pH= 7,5). Se esterilizó a 121 °C durante 15 min.

### 3.4- Reciclado de perlas de vidrio

A las perlas de vidrio (Sigma) utilizadas en la obtención de paredes celulares, se las cubrió con mezcla sulfocrómica, dejándolas en contacto con dicha solución por espacio de 48-72 hs, mezclándolas periódicamente. Transcurrido ese tiempo, se retira la mezcla sulfocrómica, y se las lava exhaustivamente con agua destilada hasta que la misma se observa límpida. Se retira la mayor cantidad de agua posible y se secan completamente en estufa a 100-140 °C. Completado este proceso, las perlas de vidrio pueden guardarse para su posterior uso.

#### **4- Reactivos y buffers utilizados durante la extracción del ADN fágico**

□ Mezcla de lisis: 2 volúmenes de EDTA (0,5 M, pH 8,1), 1 volumen de Tris-HCl (pH 9,6) y 1 volumen de SDS (10%). Se mezcla antes de usar y en este orden.

□ Tampón SM: Tris-HCl (1 M, pH 7,5) 20 ml, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) 1 ml, NaCl (5 M) 20 ml, Gelatina 1 gr, Agua destilada hasta 1 lt. Se disuelve la gelatina en 10 ml de agua con calor, y se añaden los otros componentes.

□ Buffer TE: Tris-HCl (10 mM, pH 8), EDTA (1 mM, pH 8).

- Ambas soluciones buffer se esterilizan en autoclave (121 °C, 15 min).