



---

# 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.

### **“LISOGENIA Y MECANISMOS NATIVOS DE FAGORRESISTENCIA PRESENTES EN BACTERIAS LACTICAS SALVAJES Y COMERCIALES”**

Tesista: Lic. Tec. Natalia Elisabet Maciel

Director: Dr. Jorge A. Reinheimer  
Co-Director: Mg. Viviana B. Suárez

Instituto de Lactología Industrial  
INLAIN  
UNL-CONICET

Santa Fe, Diciembre de 2008.

---



**A mi familia.-**



**agradecimientos**

---



---

Agradezco principalmente a mi director Dr. Jorge A. Reinheimer por haberme permitido formar parte a su prestigioso equipo de trabajo. Además está decir, que agradezco su infinita paciencia y la confianza que me tuvo en este tiempo.

También agradezco a mi co-directora Mg. Viviana B. Suárez, por haber colaborado conmigo en las tareas de laboratorio.

Aprovecho la oportunidad para agradecer también el apoyo incondicional de los que fueron primero compañeros de laboratorio y ahora muy buenos amigos; Dra. Daniela Gugliemotti, Dr. Diego Mercanti, Ing. Hernando Carrizo y Lic. Emilio Vigliengo.

Tampoco quiero olvidarme de Andrea, Lujan, Carina, Mario, Silvina, Cristina, Ana, Susana, Erica, Ing. Zalazar e Ing. Meinardi, profesionales de primer nivel que conforman el Instituto de Lactología Industrial.

A la Facultad de Ingeniería Química por permitirme acceder a la Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, y sentar precedente para que los Licenciados en Biodiversidad podamos acceder a este postgrado.

Y a mi familia, por su constante e incondicional apoyo.



resumen

---



---

Las bacterias lácticas desempeñan una función esencial en la elaboración de productos fermentados. Participan en el desarrollo de textura y caracteres organolépticos de numerosos alimentos. Uno de los problemas más graves que se presentan en estas fermentaciones es la infección de los cultivos (starters) con bacteriófagos, retardando o deteniendo la producción de ácido láctico, lo que conduce a variaciones de pH que afectan las características y la seguridad del producto. Por estas razones, desde el punto de vista económico, las infecciones fágicas representan cuantiosas pérdidas.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue ampliar el conocimiento sobre la interacción entre bacterias lácticas (BAL) presentes en fermentos para la industria láctea y sus fagos específicos.

Se comenzó analizando la fagorresistencia entre cepas autóctonas de *Streptococcus thermophilus*. Para ello, estas cepas fueron enfrentadas a tres fagos argentinos (CYM, YCS y T7) pudiéndose también cuantificar el nivel de resistencia de las cepas a través del EOP. En la mayoría de los casos, no pudieron observarse placas de lisis cuando la suspensión fágica se tituló sobre las cepas estudiadas, arrojando valores de EOP inferiores al límite de detección. Esto demuestra que existe un alto nivel de resistencia en todas las cepas frente a los 3 fagos específicos usados.

En cuanto a los mecanismos de fagorresistencia presentes en las cepas de *S. thermophilus* estudiadas pudo concluirse que de los 42 ensayos realizados, en el 74% de ellos se detectó una baja tasa de adsorción (< 25% de partículas virales adsorbidas) mientras que el 19% de los ensayos mostró valores superiores al 70% con la intervención de mecanismos de fagorresistencia intracelulares.

En una segunda etapa se estudió la difusión de la fagorresistencia en cepas salvajes de *Lactococcus lactis* frente a 5 fagos autóctonos (QF12, QP4, QF9, CHD y 046). Se pudo concluir que todas fueron fagorresistentes ya que manifestaron ausencia de lisis del cultivo hasta el 3° repique consecutivo. Asimismo, se determinó un alto nivel de resistencia de todas las cepas frente a los 5 fagos específicos usados. Con respecto a la estabilidad de la fagorresistencia, todas se mantuvieron resistentes hasta el 7° repique a excepción de una (*L.l.* 166) que lisó en el 3° repique frente al fago QF12. Se pudo concluir que las cepas de *L.*



---

*lactis* poseen mecanismos intracelulares de resistencia fágica altamente efectivos (posiblemente combinación de R/M y Abi).

El fenómeno de lisogenia en la cepa *Lactobacillus helveticus* CNRZ 241 se estudió en una tercera etapa. Se analizó el efecto de la temperatura y la influencia de la concentración de Mitomicina C en la tasa de liberación fágica de la cepa. Se observó que a 30 °C la concentración inicial de fagos libres del cultivo prácticamente no se modifica, observándose recién a las 7 horas un incremento de aproximadamente un orden logarítmico. Las cinéticas de liberación de fagos resultaron similares a 37 °C y 42 °C con valores máximos de  $3 \cdot 10^4$  UFP/ml alcanzados entre las 6-7 horas de incubación, luego de lo cual, los títulos fágicos descendieron hasta alcanzar los valores de  $t=0$  a las 16 horas aproximadamente. Para comprender la causa de este descenso se estudió la viabilidad de los fagos liberados en caldo MRS ajustado a pH 3,8 y 4,5, determinándose que los fagos inducidos poseen una escasa resistencia en medio ácido, perdiendo rápidamente su viabilidad.

La concentración de Mitomicina C en la evolución de la tasa de liberación fágica de la cepa no manifestó una apreciable influencia. En presencia del antibiótico, los valores máximos de recuentos alcanzaron niveles de  $6.9 \cdot 10^5$  UFP/ml a las 2,5 horas, observándose luego una disminución de los mismos. La Mitomicina C produce un cierto retardo en el crecimiento de la cepa proporcional a la concentración del antibiótico ensayado.

En este trabajo de Tesis también se determinó la frecuencia de la lisogenia entre cepas de *Lactobacillus delbrueckii* las cuales al tratarse con Mitomicina C, mostraron un descenso gradual en los valores de densidad óptica ( $DO_{560nm}$ ), comparadas con un control sin Mitomicina C. Del total de cepas testeadas, solo en un 37% del total fue posible encontrar cepas sensibles para los fagos liberados. Luego del tratamiento a 90 °C, todos los sobrenadantes dieron señal negativa sobre las mismas cepas, demostrando así la existencia de partículas virales activas o sustancias termosensibles (bacteriocinas). Pudieron encontrarse fagos capaces de proliferar y lisar cepas indicadoras para solo 3 de las cepas tratadas con Mitomicina C. Partículas virales activas pudieron ser aisladas de la cepa comercial *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1, las cuales fueron capaces de propagar sobre dos cepas hospedadoras, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 204 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 342. Según la cepa utilizada para propagarlos, los fagos aislados y purificados se denominaron Cb1/204 y



---

Cb1/342. A partir de la morfología, se determinó que son miembros de la familia *Siphoviridae* (morfortipo B1), pertenecen al Grupo B de Bradley y al grupo *c* (fagos de cabeza prolata), según la clasificación de fagos de *Lb. delbrueckii*.

En una última etapa se estudió la heterogeneidad celular de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> bajo condiciones ambientales y nutricionales no limitantes. Se aislaron dos variantes morfológicas: circular-opaca (C) y rugosa-transparentes (T). La variante C fue dominante (85 % del total de la población celular) y mostró formas celulares espiraladas mientras que la variante T exhibió una morfología bacilar estricta.

Cuando la cepa de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> se enfrentó al fago YAB, demostró ser sensible (lisis en el 1º repique). Si bien esta lisis en caldo fue rápida y evidente, no fue completa ya que pudo constatar en repetidos ensayos, un residuo celular que no lisa, (aproximadamente el 0.01 % de la población celular total). A partir de éste, solo el 0,001% de sus colonias constituyeron la fracción de la población celular confirmada como resistente. Así mismo, fue posible demostrar que la variante C (mayoritaria en la población original, 85%), presentó un bajo porcentaje de variantes realmente fagorresistente (15 %). Para la variante T (minoritaria en la población original), la proporción de variantes resistentes fue de aproximadamente un 85 %. Los valores de EOP encontrados para los mutantes fueron más bajos que el límite de detección ( $10^{-7}$ ).

La estabilidad del fenotipo fagorresistente fue alto (hasta el 7<sup>mo</sup> repique) para los mutantes que presentaron interferencia en la adsorción, todos derivados de la variante T, pero el mutante C perdió su fagorresistencia en el 4<sup>to</sup> repique. Los mutantes derivados de las variantes morfológicas T mostraron valores de adsorción (luego de 30 min) menores al 15%. Para la variante C, los valores de adsorción fueron altos y normales (93%), pero no hubo presencia de lisis en los consecutivos 3 repiques. Este hecho sugiere la existencia de un mecanismo intracelular o la combinación de sistema R/M e infección abortiva (Abi).

Con respecto a la performance industrial de estos mutantes, existió heterogeneidad y solo uno (Ab<sub>1</sub> T (b<sub>2</sub>)) mostró propiedades tecnológicas similares a la cepa madre.



**índice**

---



INDICE	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	7
1.1 LAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)	8
1.1.1 Características generales	8
1.1.2 Filogenia	9
1.1.3 Géneros integrantes de cultivos iniciadores	12
1.1.3.1 <i>Lactococcus</i>	12
1.1.3.2 <i>Streptococcus</i>	13
1.1.3.3 <i>Leuconostoc</i>	13
1.1.3.4 <i>Pediococcus</i>	14
1.1.3.5 <i>Enterococcus</i>	14
1.1.3.6 <i>Lactobacillus</i>	15
1.2 LOS BACTERIOFAGOS	18
1.2.1 Características morfológicas	18
1.2.2 Clasificación y taxonomía	20
1.2.3 Los fagos de bacterias lácticas	22
1.2.3.1 Fagos de <i>Lactococcus</i>	26
1.2.3.2 Fagos de <i>Lactobacillus</i>	27
1.2.3.3 Fagos de <i>Streptococcus</i>	27
1.2.4 Ciclo de vida	29
1.2.4.1 Ciclo lítico	31
1.2.4.2 Ciclo lisogénico	33
1.2.4.3 Pseudolisogenia	36
1.2.5 Mecanismos nativos de fagoresistencia	37
1.2.5.1 Interferencia en la etapa de adsorción	37
1.2.5.2 Bloqueo de la infección del ADN viral	39
1.2.5.3 Restricción/Modificación (R/M)	40
1.2.5.4 Infección Abortiva (Abi)	41
1.2.5.5 Inmunidad Lisogénica	42
1.2.6 Prevención de la infección fágica	43



1.2.6.1	Medios inhibidores de fagos	43
1.2.6.2	Uso de cultivos fagorresistentes	44
1.2.6.3	Rotación de cultivos	44
1.2.6.4	Cultivos de inoculación directa (DVS)	45
1.2.6.5	Mutantes espontáneos fagorresistentes	46
1.2.6.6	Cepas insensibles a fagos	47
1.3	HETEROGENEIDAD CELULAR EN BACTERIAS LACTICAS	48
2.	<b>OBJETIVOS</b>	52
3.	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	54
3.1	CEPAS	55
3.1.1	Cepas usadas	55
3.1.1.1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	55
3.1.1.2	<i>Lactococcus lactis</i>	55
3.1.1.3	<i>Lactobacillus helveticus</i>	55
3.1.1.4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	55
3.1.2	Conservación de cepas	56
3.1.2.1	Congelamiento en leche descremada reconstituida (LDR)	56
3.1.2.2	Congelamiento en caldo-glicerol	56
3.2	FAGOS	56
3.2.1	Fagos usados	56
3.2.1.1	Fagos de <i>Streptococcus thermophilus</i>	56
3.2.1.2	Fagos de <i>Lactococcus lactis</i>	57
3.2.1.3	Fagos de <i>Lactobacillus helveticus</i>	57
3.2.1.4	Fagos de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	57
3.2.2	Conservación de fagos	57
3.3	INTERACCION CEPA-FAGO	58
3.3.1	Propagación de fagos	58
3.3.2	Titulación de fagos	58
3.3.3	Ensayo de sensibilidad en medio líquido (Test de turbidez)	59



3.3.4	Spot Test	59
3.4	CARACTERIZACION DE LA FAGORRESISTENCIA	60
3.4.1	EOP ( Eficiencia de plaqueo)	60
3.4.2	Estabilidad de la fagorresistencia	60
3.4.3	Estudio de los mecanismos de fagorresistencia	60
3.4.3.1	Adsorción	60
3.4.3.2	Restricción/Modificación (R/M)	61
3.5	LISOGENIA EN <i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 0241	61
3.5.1	Cepas y fagos usados	61
3.5.2	Medios de cultivo	62
3.5.3	Liberación espontánea del profago CNRZ 0241	62
3.5.3.1	Influencia de la temperatura	62
3.5.3.2	Influencia del pH en la viabilidad de los fagos	62
3.5.4	Influencia de la concentración de Mitomicina C en la liberación del profago CNRZ 0241	63
3.6	DIFUSIÓN DE LA LISOGENIA EN <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	63
3.6.1	Inducción con Mitomicina C y detección de cepas sensibles	63
3.6.2	Aislamiento y purificación de fagos temperados liberados	63
3.6.3	Micrografía electrónica de los fagos temperados aislados	66
3.7	HETEROGENEIDAD CELULAR Y FAGORRESISTENCIA EN <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> Ab <sub>1</sub>	66
3.7.1	Obtención de variantes morfológicas	66
3.7.2	Morfología celular	66
3.7.3	Obtención de mutantes espontáneos fagorresistentes	67
3.7.4	Caracterización de la fagorresistencia	67
3.7.5	Caracterización bioquímica de las variantes morfológicas fagorresistentes (Perfil fermentativo de azúcares)	67
3.7.6	Caracterización tecnológica de las variantes morfológicas fagorresistentes	68
3.7.6.1	Actividad Acidificante	68



3.7.6.2	Actividad Proteolítica	68
3.7.7	Caracterización genética de las variantes morfológicas fagorresistentes	69
3.7.7.1	Extracción del ADN total	69
3.7.7.2	Amplificación del gen 16S del rRNA y restricción con <i>Eco RI</i> (PCR-ARDRA) PCR-amplified ribosomal DNA restriction analysis	70
3.7.7.3	RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR)	71
4.	<b>RESULTADOS</b>	73
4.1.	FAGORRESISTENCIA EN <i>Streptococcus thermophilus</i>	74
4.1.1.	Difusión de la fagorresistencia en cepas salvajes de <i>S. thermophilus</i>	74
4.1.2.	Caracterización de la fagorresistencia en cepas salvajes de <i>S. thermophilus</i>	74
4.1.2.1.	EOP (Eficiencia de plaqueo)	74
4.1.2.2.	Estabilidad de la fagorresistencia	74
4.1.3.	Estudio de los mecanismos de fagorresistencia	75
4.1.3.1.	Interferencia en la adsorción	75
4.2.	FAGORRESISTENCIA EN <i>Lactococcus lactis</i>	77
4.2.1.	Difusión de la fagorresistencia en cepas salvajes de <i>L. lactis</i>	77
4.2.2.	Caracterización de la fagorresistencia en cepas de <i>L. lactis</i>	77
4.2.2.1.	EOP (Eficiencia de plaqueo)	77
4.2.2.2.	Estabilidad de la fagorresistencia	77
4.2.3.	Estudio de los mecanismos de fagorresistencia	77
4.2.3.1.	Interferencia en la adsorción	77
4.3.	LISOGENIA EN <i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 241	78
4.3.1.	Liberación espontánea del profago CNRZ 0241	78
4.3.1.1.	Influencia de la temperatura	78
4.3.1.2.	Influencia del pH en la viabilidad del profago liberado	78
4.3.2.	Influencia de la concentración de Mitomicina C en la liberación del profago CNRZ 0241	80



4.4.	DIFUSIÓN DE LISOGENIA EN <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	82
4.4.1.	Inducción con Mitomicina C y aislamiento de fagos temperados	82
4.4.2.	Características morfológicas de los fagos temperados aislados	84
4.5.	HETEROGENEIDAD CELULAR Y FAGORRESISTENCIA EN <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ab <sub>1</sub>	85
4.5.1.	Obtención de variantes morfológicas	85
4.5.2.	Caracterización de la morfología celular y de las colonias	88
4.5.3.	Obtención de variantes fagorresistentes	89
4.5.4.	Caracterización de la fagorresistencia	92
4.5.5.	Caracterización bioquímica de las variantes morfológicas y fagorresistentes	93
4.5.6.	Caracterización genética de las variantes morfológicas y fagorresistentes	96
4.5.7.	Caracterización tecnológica de las variantes morfológicas y fagorresistentes	99
5.	<b>DISCUSIÓN</b>	100
6.	<b>CONCLUSIONES</b>	112
7.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	115
8.	<b>ANEXO</b>	127



## **introducción**

---



## 1.1 LAS BACTERIAS LACTICAS (BAL)

---

### 1.1.1 Características generales

Las bacterias lácticas son microorganismos asociados a hábitats ricos en nutrientes, particularmente azúcares simples. Estos ambientes incluyen leche cruda, carnes, frutas y vegetales. También son parte de la microflora normal de los conductos de glándulas mamarias, boca, intestino y vagina de los mamíferos (Frank y Hassan, 1998).

Una definición exacta de BAL no existe. Por lo tanto, lo más apropiado es decir que una bacteria ácido láctica “típica” es la que posee las siguientes características (Axelsson, 1998):

- ✓ Gram +
- ✓ Ausencia de esporulación
- ✓ Morfología cocoide o bacilar, nunca en espirales
- ✓ El principal producto final del metabolismo de los azúcares es el **ÁCIDO LÁCTICO**
- ✓ Generalmente no móviles
- ✓ Ácido tolerancia
- ✓ Catalasa negativa
- ✓ Carencia de citocromos
- ✓ Anaerobias o aerotolerantes
- ✓ Responsables de una fermentación homoláctica (convierten la glucosa en ácido láctico como producto final) o heteroláctica (convierten la glucosa a ácido láctico, etanol o ácido acético, y dióxido de carbono como productos finales)
- ✓ Se ubican en un amplio rango de temperatura para el crecimiento (10°C -45°C)
- ✓ Tolerancia a la sal
- ✓ No producen pigmentos
- ✓ No reducen los nitratos

Existen 13 géneros bacterianos que responden a estas características: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,



*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragonococcus*, *Vagococcus*, *Weisella* y *Oenococcus*. Sin embargo, tan solo los siguientes géneros tienen importancia desde el punto de vista industrial (Limsowtin y col, 2003):

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

Estos son comúnmente encontrados en cultivos iniciadores artesanales y comerciales para alimentos fermentados. Un quinto género, *Enterococcus*, es sólo ocasionalmente encontrado en cultivos iniciadores artesanales (Frank y Hassan, 1998).

El género *Bifidobacterium* ha sido históricamente también incluido como miembro del grupo de las BAL ya que concuerda bastante bien con la descripción general del grupo, pero al poseer una vía de fermentación de azúcares diferente, actualmente se lo considera excluido de este grupo (Axelsson, 1998).

### 1.1.2 Filogenia

Las comparaciones de secuencias de rRNAs son actualmente consideradas como la medida óptima para determinaciones de las verdaderas relaciones filogenéticas entre las bacterias (Axelsson, 1998).

Avances en las técnicas de biología molecular han permitido diseñar métodos para secuenciar las cadenas de rRNA, primeramente a través del uso de transcriptasa reversa (Axelsson, 1998) y en la actualidad fueron reemplazadas con la secuenciación directa de productos PCR provenientes de genes que codifican el rRNA.

Las bacterias Gram + puede ser divididas en dos grupos principales, según posean elevado o bajo porcentaje molar de G+C en el ADN.

El primer grupo con elevado porcentaje molar de G+C (*Actinomycetes*) incluye a (Krieg y Holt, 1984; Axelsson, 1998):

- ✓ *Bifidobacterium*



- ✓ *Arthrobacterium*
- ✓ *Micrococcus*
- ✓ *Propionibacterium*
- ✓ *Corynebacterium*
- ✓ *Actinomyces*
- ✓ *Streptomyces*

El grupo con bajo porcentaje molar de G+C, (*Clostridium*) incluye a todas las BAL y a bacterias aerobias facultativas, como son:

- ✓ *Bacillus*
- ✓ *Staphylococcus*
- ✓ *Listeria*

y a las anaerobias:

- ✓ *Clostridium*
- ✓ *Peptococcus*
- ✓ *Ruminococcus*

Las BAL pertenecen entonces a un “*súper cluster*” en el cual filogenéticamente se unen con géneros estrictamente anaerobios (Ej.: clostridios) y géneros facultativamente o estrictamente aerobios (Ej.: *Staphylococcus* y *Bacillus*).

Según el árbol filogenético de la Fig. 1, *Carnobacterium*, *Enterococcus* y *Vagococcus* constituyen un estrecho cluster y los géneros *Aerococcus* y *Tetragonococcus* pueden ser incluidos en el mismo como grupos periféricos. Además, este grupo de géneros está más cercano filogenéticamente con los aerobios y anaerobios facultativos de la división de bajo contenido de G+C, que el resto de las BAL.

Los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus* están aun más relacionados con el resto de los géneros que con las otras BAL.

Las BAL “tipo leuconostoc” (*Weisella*, *Oenococcus* y *Leuconostoc* sensu stricto) están claramente relacionadas. *Oenococcus* también pertenece a esta rama aunque la distancia evolutiva con *Leuconostoc* sea grande.



Los restantes grupos de BAL, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, constituyen un súper cluster dentro de las BAL, el cual puede ser dividido en dos subclusters:

- ✓ Subcluster 1: GRUPO *Lactobacillus delbrueckii*: contiene algunos, pero no todos, lactobacilos homofermentativos obligados:
  - ✓ *Lb. delbrueckii*
  - ✓ *Lb. acidophilus*
  - ✓ *Lb. helveticus*y los heterofermentativos obligados.
- ✓ Subcluster 2: GRUPO *Lb. casei-Pediococcus*: incluye todos los géneros restantes de lactobacilos (homofermentativos obligados, todos los heterofermentativos y la mayoría de los heterofermentativos facultativos), además de los pediococcos.-

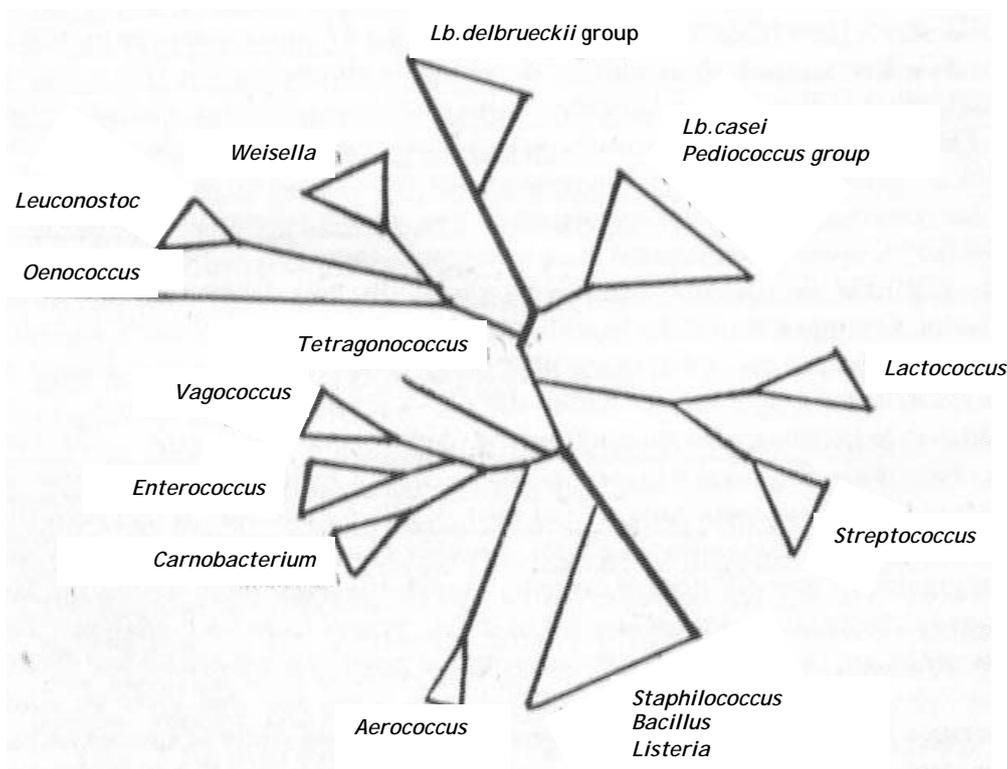


Fig. 1. Árbol filogenético que muestra la relación entre los géneros de BAL (Axelsson, 1998).



### 1.1.3 Géneros integrantes de cultivos iniciadores

#### 1.1.3.1 *Lactococcus*

Los lactococos son las principales BAL mesófilas usadas para la obtención de productos lácteos fermentados. En este género se pueden reconocer cinco especies (Limsowtin y col., 2003):

- ✓ *Lactococcus lactis*
- ✓ *L. garvieae*
- ✓ *L. plantarum*
- ✓ *L. piscium*
- ✓ *L. raffinolactis*

*L. lactis* es la especie más significativa como responsable de fermentaciones lácticas. Sus células son cocos esféricos u ovoides (0,5-1,2 x 0,5-1,2  $\mu\text{m}$ ), generalmente en pares o cadenas. Son homofermentativos cuando crecen en leche y más del 95% de sus productos finales es ácido láctico. Son débilmente proteolíticas y usan proteínas lácteas (caseína). Existen 2 subespecies: *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, cuyas diferencias se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferenciación entre las subespecies de *Lactococcus lactis* (Frank y Hassan 1998).

Características	<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	
	<i>lactis</i>	<i>cremoris</i>
Prod. de ácido a partir de		
Lactosa	+	+
Galactosa	+	+
Maltosa	+	-
Ribosa	+	-
Crecimiento en 4% de sal	+	-
Hidrólisis de arginina	+	-



Una variante de *L. lactis* (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) convierte el citrato a diacetilo, dióxido de carbono y otros compuestos aromáticos característicos del queso Gouda. Por esta capacidad de metabolizar el citrato se la denomina Cit + (Limsowtin y col., 2003).

#### 1.1.3.2 *Streptococcus*

La única especie integrante de cultivos termófilos usados en la producción de yoghurt y algunos tipos de quesos es *Streptococcus thermophilus*, que se diferencia del resto de los estreptococos (y lactococos) por su resistencia térmica, capacidad de crecer a 45 °C y fermentar sólo un número limitado de hidratos de carbono (Krieg y Holt, 1984; Axelsson, 1998).

La mayoría de los productos lácteos fermentados a elevadas temperaturas (>40°C) son acidificados por la combinación de *S. thermophilus* y *Lactobacillus spp.*

Típicamente crecen como cocos ovoides o esféricos (0.5-2.0 µm de diámetro), en pares o cadenas.

#### 1.1.3.3 *Leuconostoc*

*Leuconostoc* tiene 11 especies reconocidas. Este grupo se diferencia del resto de las BAL por poseer células cocoides dispuestas espacialmente en pares o cadenas de células elongadas o esféricas (0,5-0,7 x 0,7-1,2 µm), ser mesófilo heterofermentativo productor de ácido láctico a partir de glucosa, no productor de amoníaco a partir de arginina y requerir de vitaminas del grupo B para crecer. Es usado en la industria láctea ya que a partir de citrato produce dióxido de carbono (formador de ojos en quesos tales como el Gouda y Edam), acetoína y diacetilo, este último principal componente del flavor en manteca y crema. Solo dos especies están asociadas con cultivos lácteos iniciadores, *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* (antes *Lc. citrovorum*) y *Lc. lactis*. Ambos se diferencian por su habilidad para fermentar varios hidratos de carbono. En cultivos iniciadores aparece en combinación con lactococos cuando la producción de diacetilo y dióxido de carbono es requerida además de la acidificación (Frank y Hassan, 1998).



#### 1.1.3.4 *Pediococcus*

Siete especies de *Pediococcus* son corrientemente reconocidas. Las células esféricas de *Pediococcus* forman tétradas distinguibles de los cocos formadores de cadenas. Puede ser descrito como la única bacteria acidófila homofermentativa que se divide alternativamente en dos direcciones perpendiculares para formar las tétradas.

Tienen una gran importancia tecnológica alimentaria, en ambos sentidos, negativo y positivo. *P. damnosus* es el principal microorganismo alterador en la manufactura cervecera, debido a que su desarrollo deriva en la producción de diacetilo y acetona, brindándole a la cerveza un sabor a manteca.

Debido a sus propiedades antimicrobianas, algunas cepas de pediococos han sido recientemente usadas a través de su incorporación en algunos alimentos fermentados, y muchas pediocinas (bacteriocinas producidas por pediococos) están en la actualidad comercialmente admitidas como aditivos para producir alimentos sanos, especialmente para la eliminación de *Listeria*.

Los pediococos pueden ser también importantes constituyentes del conocido complejo NSLAB (bacterias ácido lácticas no integrantes del fermento) las cuales están involucradas en la maduración de quesos (Axelsson, 1998).

#### 1.1.3.5 *Enterococcus*

Los enterococos poseen células esféricas u ovoides (0,6-2,0 x 0,6-2,5  $\mu\text{m}$ ) generalmente dispuestas de a pares y en cadenas cortas. No son típicamente considerados importantes en tecnología alimentaria. Actualmente se han reconocido 19 especies de enterococos, los cuales son encontrados en una gran variedad de hábitats incluidos el intestino humano y de otros mamíferos monogástricos, plantas verdes, ensilados, leche, tierra y en asociaciones con insectos, aves y otras especies salvajes. *Enterococcus faecium*, y *E. faecalis* son encontrados en muchos quesos elaborados a partir de leche cruda. En quesos Fontina, los enterococos suelen ser flora dominante, aún cuando *E. faecalis* es considerado un



patógeno oportunista. Algunos enterococos actualmente son propuestos como cepas probióticas, principalmente en usos veterinarios (Limsowtin y col, 2003).

Una reciente investigación indica que los enterococos pueden ser divididos en “liogrupos” basándose en su actividad lítica contra los micrococos. Estos liogrupos fueron correlacionados con homologías de ADN entre las especies (Axelsson ,1998). Las principales características del género son:

- ✓ Tolerantes a la sal (crecen con 6,5% NaCl)
- ✓ Termotolerantes. Amplio rango térmico de crecimiento (10°C-45°C)
- ✓ Crecen a pH 9,6
- ✓ Producen NH<sub>3</sub> a partir de arginina
- ✓ Poseen el antígeno del grupo D
- ✓ Ambas especies (*E. faecium* y *E. faecalis*) se diferencian entre si por la reducción de telurito y por el perfil de fermentación de azúcares.

#### 1.1.3.6 *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* constituye un grupo heterogéneo genética y fisiológicamente, de BAL en forma de bacilos. Comprende entre 50 y 80 especies reconocidas, basadas en la composición de ADN, el cual está en el rango de 32-35% de G+C. La división del grupo está basada primariamente en las características de la vía de fermentación usada y sus productos finales.

- ✓ GRUPO I (*Homofermentativos*): las especies de este grupo metabolizan las hexosas a través de la vía glicolítica Embden-Meyerhod y el ácido láctico es el principal producto final bajo típicas condiciones de fermentación láctica. No fermentan las pentosas ni el gluconato. Algunas de sus especies tienen gran importancia en la fabricación de quesos, yogur y bebidas probióticas. Los lactobacilos comúnmente encontrados en cultivos iniciadores son *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. helveticus*, estos dos últimos importantes componentes de cultivos iniciadores usados para quesos duros italianos y suizos.



- ✓ GRUPO II (*Heterofermentativos facultativos*): metabolizan las hexosas a través de la misma vía que las homofermentativas, pero las pentosas y los otros sustratos son metabolizados por la vía fosfocetolasa obteniendo como producto final ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol. Estas bacterias están asociadas con ensilados y bebidas fermentadas. El grupo incluye a *Lb. casei*, el cual no es muy común de encontrar en cultivos iniciadores pero sí asociado con la fermentación secundaria durante la maduración de quesos (bacterias NSLAB) o como bacteria probiótica en leches fermentadas.
- ✓ GRUPO III (*Heterofermentativos obligados*): utilizan sólo la vía fosfocetolasa para metabolizar azúcares (a veces pentosas) y el ácido láctico nunca es el único producto final. Producen significativas cantidades de ácido acético y/o etanol, con generación de dióxido de carbono. Normalmente se los ve asociados a productos lácteos, sobretudo en la maduración de quesos, aunque a veces causan indeseables flavors y formación de gas durante la maduración quesera. *Lb. kefir* está asociado a cultivos utilizados en la producción de kefir (Limsowtin y col , 2003).

Los lactobacilos son un grupo de bacilos Gram + (0,5-1,2 x 1,0-10 µm), en el que pueden encontrarse bacilos largos en cadenas cortas, bacilos cortos en cadenas largas y células aisladas. Son el grupo más ácido-tolerante de las BAL, prefiriendo condiciones iniciales de crecimiento a pH ácidos (5,5-6,2) y bajando el pH de la leche hasta 4,0 o menos. A veces, su crecimiento es lento en leche si el cultivo es puro. Por esta razón, habitualmente se los usa en combinación con *S. thermophilus*. Se los encuentra en hábitat con azúcares fermentables, vitaminas, cofactores, productos proteicos hidrolizados y baja tensión de oxígeno. En la industria láctea sólo unas pocas especies de *Lactobacillus* son usadas en cultivos iniciadores, mientras que gran número de ellas son encontradas en la flora secundaria de quesos (Tabla 2.) (Frank y Hassan, 1998).



Tabla 2. Características de lactobacilos asociados con productos lácteos (Frank y Hassan ,1998).

Grupo/Especie	Usados para	Crecimiento		Isómero de ácido láctico producido	G+C (%)	Perfil de azúcares					
		15°C	45°C			Glucosa	Galactosa	Lactosa	Maltosa	Sucrosa	Ribosa
<b>HOMOFERMENTATIVOS</b>											
<i>Lb. delbrueckii</i>											
subsp <i>bulgaricus</i>	Yogur, kumiss, quesos de pasta cocida	-	+	D	49-51	+	-	+	-	-	-
subsp <i>lactis</i>	Quesos duros	-	+	D	49-51	+	d <sup>a</sup>	+	+	+	-
<i>Lb. acidophilus</i>	Leche acidófila, laban	-	+	DL	34-37	-	+	+	+	+	-
<i>Lb. helveticus</i>	Quesos de pasta cocida	-	+	DL	38-40	+	+	+	d	-	-
<b>HETEROFERMENTATIVOS FACULTATIVOS</b>											
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	Quesos duros	+	-	L	45-47	+	+	d	+	+	+
<b>HETEROFERMENTATIVOS OBLIGADOS</b>											
<i>Lb. kefir</i>	CEFIR	+	-	DL	41-42	+	-	+	+	-	+

<sup>a</sup> algunas cepas son positivas.

Abreviaturas: Glu: glucosa; Gal: galactosa; Lac: lactosa; Mal: maltosa; Suc: sucrosa; Rib: ribosa



## 1.2. LOS BACTERIOFAGOS

---

### 1.2.1. Características morfológicas

Los virus son entidades que se localizan en el umbral que separa lo vivo de lo inerte. No son seres celulares, no se mueven por sí mismos y no son capaces de realizar actividades metabólicas de una manera independiente. Estas partículas son capaces de reproducirse, pero solo dentro del complejo ambiente que prevalece en el interior de las células vivas que infectan. Puede decirse, en cierto sentido, que los virus solo están vivos cuando han infectado a una célula.

Un virus o virión, es una partícula diminuta formada por un núcleo de ácido nucleico rodeado por una cubierta proteínica a la que se denomina cápside. Algunos virus poseen una cubierta externa que contienen lípidos y carbohidratos. Todos contienen ADN o ARN, jamás los dos. Así existen virus con ADN y virus con ARN. Cualquiera sea el tipo de material nucleico que posee el virus, dicho material constituye su información genética o genoma. El genoma viral puede constar de menos de cinco genes o hasta varios cientos de ellos.

La mayoría de los virus son mucho más pequeños que las bacterias, midiendo apenas unos 100 nm de diámetro en promedio. La forma de los virus es determinada por la organización de las subunidades que integran la cápside. Los virus son en general helicoidales o poliédricos, o bien presentan una combinación de ambas formas.

Los virus que infectan las bacterias de cultivos iniciadores se denominan bacteriófagos o simplemente fagos. Existen muchas variedades de bacteriófagos y, por lo general, son específicos para cada especie (e incluso para cada cepa), lo que significa que un tipo de fago solo ataca a una especie (o cepa) de bacterias. Usualmente consisten de una cabeza o nucleocápside que contiene una doble cadena lineal de ADN donde el contenido de G+C en el genoma es similar al contenido en los cromosomas de las células hospedadoras, reflejando la íntima relación existente entre el fago y las bacterias. La cantidad de ADN más proteínas a ser contenida en el interior de la cabeza está limitada por el tamaño de ésta (Josephsen y Neve, 1998). La cápside está compuesta por numerosas unidades repartidas (idénticas o no) que se ubican en patrones definidos. La función de las cápsides es proteger a



los genomas virales de agentes externos (como enzimas, temperatura, etc) y pueden presentar (Solomon y col, 1987):

- ✓ *Simetría helicoidal*: el ácido nucleico se encuentra como un filamento extendido, rodeado por moléculas de proteínas dispuestas helicoidalmente. Los virus que poseen este tipo de organización tienen características propias en lo que se refiere a longitud, ancho, periodicidad, flexibilidad y estabilidad.
- ✓ *Simetría icosaédrica*: el ácido nucleico se encuentra condensado y forma la porción central de una núcleo-cápside casi esférica. Aquí, la cápside consiste en una cubierta de moléculas proteicas arracimadas en pequeños grupos denominados capsómeros, los cuales varían de forma y tamaño entre un virus y otro.

Los bacteriófagos más complejos poseen una cabeza que comprende el genoma del fago encerrado en una única capsida (nucleocápside) que habitualmente es hexagonal y puede ser o no elongada, y una cola que sirve como órgano de adherencia a la célula, a través de la cual el fago introduce el ADN dentro de la bacteria. A este tipo de fagos pertenecen todos aquellos que infectan a las bacterias lácticas. La complejidad de la cola varía de fago a fago, pero en general sigue tres patrones:

- ✓ La más simple corresponde a una cola corta, muy simple (por ej. los colifagos T3 y T7)
- ✓ La cola es de mayor longitud, pero de estructura simple: un tubo flexible no contráctil que puede o no tener un extremo redondeado o uno o diversas espículas o fibras en su extremo distal (ej. colifagos T1 y  $\lambda$ )
- ✓ El patrón más complejo consiste en colas con un centro hueco que está adherido a un extremo a la cabeza y en el extremo distal presenta una base hexagonal a la cual se adhieren 6 espículas y 6 largas fibras dobladas al medio. Un delgado collar está adherido al centro, cerca de la cabeza y rodeado en casi toda la longitud por una vaina compuesta por 24 anillos de capsómeros dispuestos en forma helicoidal. Estas colas, compuestas por diferentes especies proteicas, sirven como jeringas por medio de las cuales el ADN es inyectado en la célula (ej. colifagos T-pares como T4), (Neve, 1996).

Los fagos son de tamaño mucho menor que las células en las que se hospedan, y pueden ser separados de estas, mediante la filtración a través de membranas de un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , quedando las bacterias retenidas. No se pueden visualizar mediante



microscopio óptico, y solo con la disponibilidad del microscopio electrónico de transmisión, se pudo conocer su morfología.

### 1.2.2. Clasificación y taxonomía

La clasificación de Bradley (1967) de virus bacterianos, se basa fundamentalmente en características morfológicas (Fig. 2, Tabla 3.). De acuerdo a las características de la cola, incluye en el grupo A a los fagos con colas contráctiles, dentro del grupo B, a los que tienen colas largas no contráctiles y dentro del grupo C, a los que poseen colas cortas y no contráctiles. A su vez, los clasifica según la forma de la cabeza: el grupo 1, donde incluye los de cabeza isométrica; el 2 y 3 para los de cabeza prolata pequeña o grande, respectivamente. Los morfotipos básicos resultan de la interpretación de estos dos agrupamientos ( el morfotipo B<sub>1</sub> contendrá aquellos fagos de cola larga no contráctil y cabeza isométrica) (Bradley, 1967).

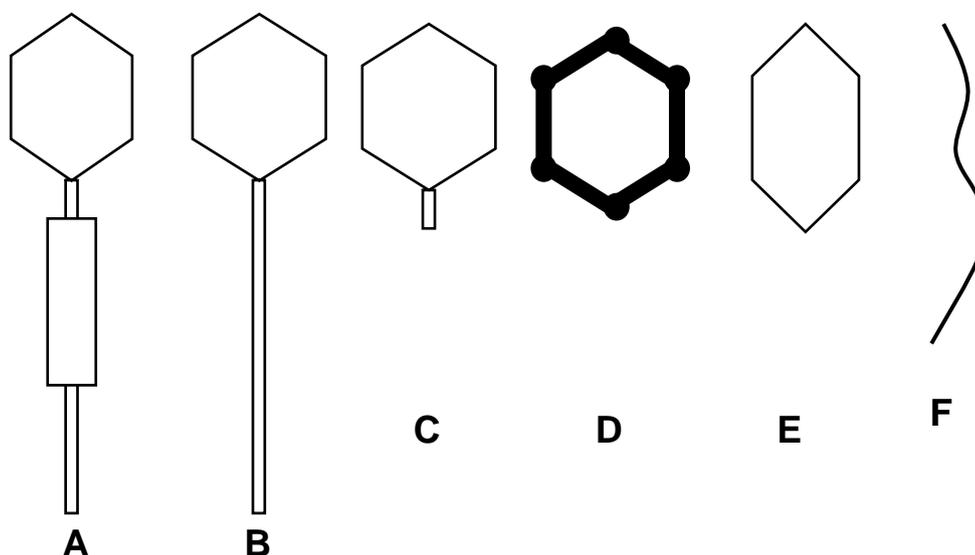


Fig. 2. Tipos morfológicos básicos de bacteriófagos (Bradley, 1967).



Tabla 3. Grupos morfológicos básicos de bacteriófagos y tipo de ácido nucleico (Bradley, 1967).

GRUPO	DESCRIPCIÓN	TIPO DE ÁCIDO NUCLEICO
A	Cola contráctil	2-ADN
B	Cola larga no contráctil	2-ADN
C	Cola corta no contráctil	2-ADN
D	Sin cola, capsómeros grandes	1-ADN
E	Sin cola, capsómeros pequeños	1-ARN
F	Sin cabeza, filamento flexible	1-DNA

Referencias: 1: simple cadena, 2 : doble cadena

Por otra parte, según una clasificación mas actualizada de Ackermann y DuBow (1987), aquellos tres grupos básicos (morfotipos A, B, y C de Bradley), se encuentran ubicados dentro de las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, respectivamente (Fig. 3) (Ackermann y DuBow, 1987).

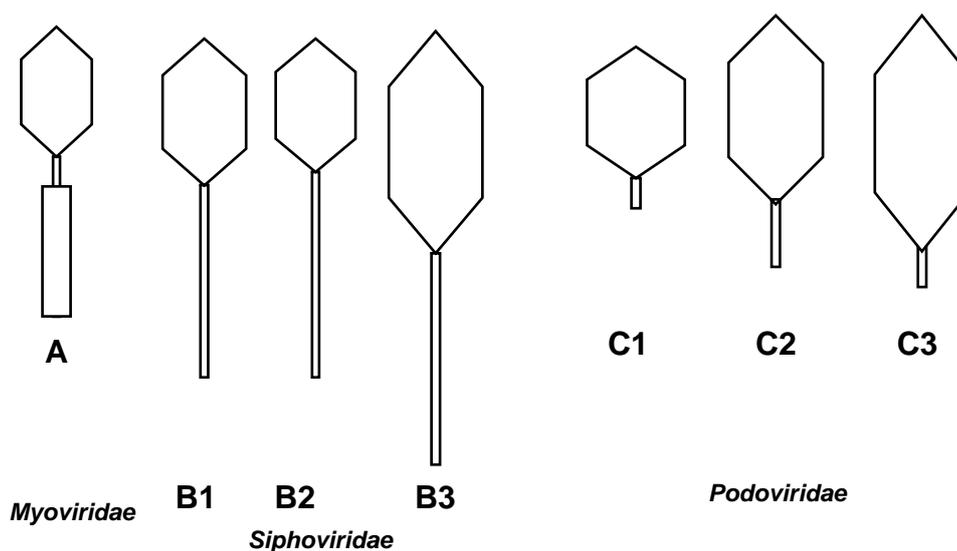


Fig. 3. Familias y morfotipos básicos de fagos de bacterias lácticas (Ackermann y DuBow, 1987)



El Comité Internacional de Taxonomía Fágica (ICTV) actualmente clasifica a los virus en 3 órdenes, 61 familias y 241 géneros (Ackerman, 2003). Los bacteriófagos constituyen un orden, con 13 familias, y 30 géneros, pudiendo poseer una cola, o ser poliédricos, filamentosos o pleomórficos. La mayoría de los fagos contienen 2-ADN, pero hay un pequeño grupo de fagos con 1-ADN, 1-ARN o 2-ARN. Unos pocos tipos tienen envolturas lipídicas o contienen lípidos como parte de la pared de la partícula. De acuerdo al último registro fágico, los fagos con cola comprenden al menos 4950 virus (Ackerman, 2003). Ellos son clasificados dentro del orden *Caudovirales*, con 3 familias relacionadas filogenéticamente. Los fagos poliédricos, filamentosos y pleomórficos (PFP) comprenden cerca de 190 virus y son clasificados dentro de 10 pequeñas familias las cuales difieren en la mayoría de sus propiedades básicas. El ICTV ha adoptado el concepto de POLYTHETIC SPECIES, en el cual las especies están definidas a través de una serie de propiedades, algunas de las cuales pueden encontrarse ausentes en algún miembro (Tabla 4.) (Ackerman, 2003).

### 1.2.3. Los fagos de bacterias lácticas

Los fagos de bacterias lácticas poseen una estructura binaria. Constan de una cabeza y una cola, las cuales están constituidas por una variedad de proteínas. Las cabezas tienen forma icosaédrica o tetraédrica, siendo algunas isométricas y otras elongadas (cabeza prolata).

En su interior se empaqueta el ácido nucleico, que es siempre ADN doble cadena (2-ADN), con una longitud de entre 20 y 60 Kb. La cola es un pequeño tubo que se une a la cabeza (en algunos mediante un collar), pudiendo ser una estructura rígida o flexible que aparece al microscopio electrónico con un estriado característico. La cola esta formada por unidades proteicas dispuestas en forma helicoidal, formando un canal interno y su longitud es variable, entre 24 y más de 500 nm.

Además, algunos poseen colas con vainas contráctiles. La placa basal es una estructura compleja que tiene por función el “anclaje” del fago a la célula sensible (hospedadora) y a este fin puede contener en algunos casos estructuras llamadas fibras (una o varias) (Fig. 4.) (Josephsen y Neve, 1998; Heap y Xanst, 2003).

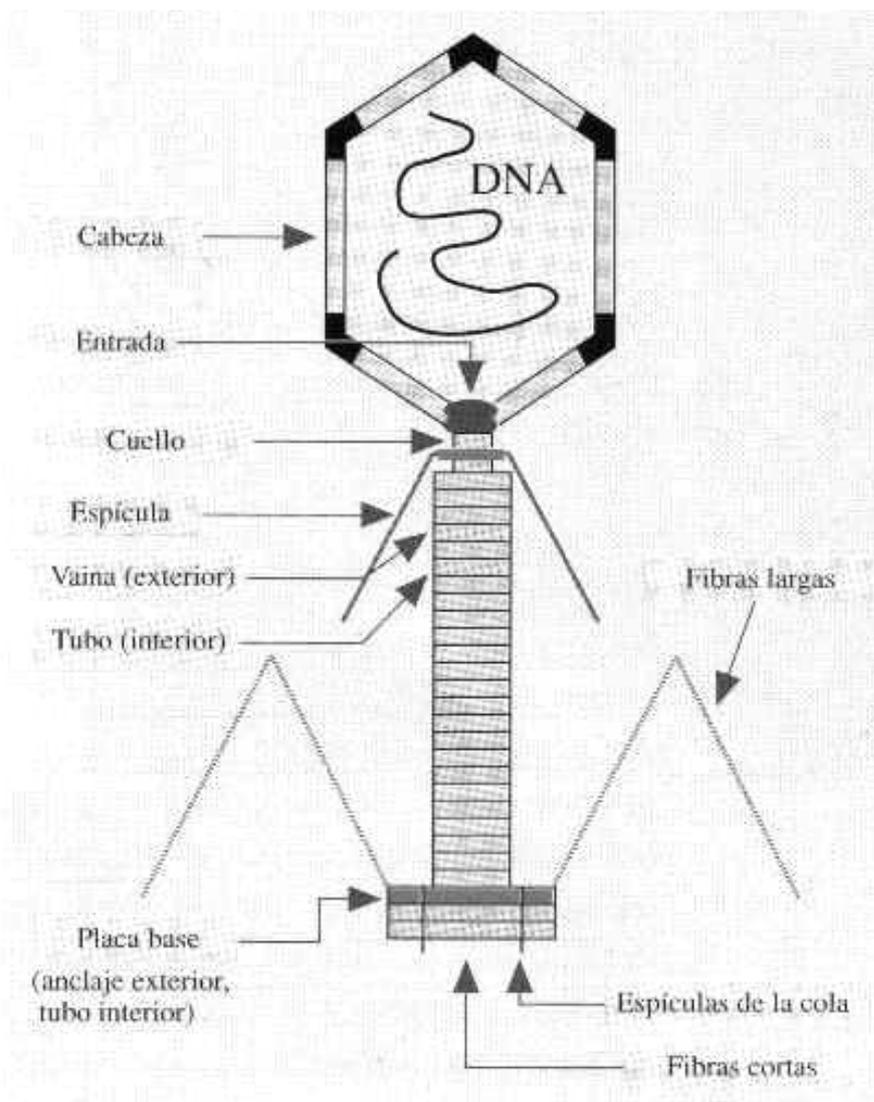


Fig. 4. Morfología básica de un bacteriófago de BAL (Chr. Hansen ,1998).



Tabla 4. Clasificación y propiedades básicas de los bacteriófagos, según el ICTV (Ackerman, 2003).

FORMA	ACIDO NUCLEICO	ORDEN Y FAMILIA	N ° GENEROS INCLUIDOS	EJEMPLOS DE FAGOS	N ° DE MIEMBROS	CARACTERÍSTICA PARTICULAR
Con cola	DNA,dc,L	<i>Caudovirales</i>	15		4950	
		<i>Myoviridae</i>	6	T <sub>4</sub>	1243	Cola contráctil
		<i>Siphoviridae</i>	6	λ	3011	Cola larga no contráctil
		<i>Podoviridae</i>	3	T <sub>7</sub>	696	Cola corta
Poliédrica	DNA,sc,C dc,C;T dc;L	<i>Microviridae</i>	4	ΦX174	40	
		<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	32	Cápside compleja, lípidos
		<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	18	Vesícula interna lipoproteica
		<i>Leviviridae</i>	2	MS2	39	
		<i>Custoviridae</i>	1	Φ6	1	Envoltura lipídica
Filamentosa	DNA,sc,C dc,L dc,L	<i>Inoviridae</i>	2	fd	57	Filamentosos, cocos
		<i>Lipothrixviridae</i>	1	TTVI	6 ?	Envoltura lipídica
		<i>Rudiviridae</i>	1	SIRVI	2	
Pleomórfica	DNA,dc,C,T dc,C,T	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	6	Envoltura, lípidos, sin cápside
		<i>Fuselloviridae</i>	1	SSVI	8?	Forma de huso, sin cápside

Referencias: C: circular; L: linear; S: segmentado; T: superficial; sc: simple cadena; dc: doble cadena.



Los fagos de BAL pueden ser clasificados según diversos criterios que ofrecen una gran utilidad: espectro de huéspedes, perfil proteico, morfología, serología u homología del ADN (Bradley, 1967):

- *Según el espectro de hospedadores:* este tipo de clasificación carece de importancia taxonómica pero tiene una gran utilidad práctica, permitiendo conocer los grupos de bacterias sensibles a determinados virus.
- *Según el perfil proteico:* por electroforesis de las proteínas de la cabeza y la cola se pueden obtener patrones característicos, que son similares para fagos relacionados. En general, los fagos poseen de una a tres fracciones proteicas mayoritarias, acompañadas por unas pocas fracciones proteicas menores. Esta técnica es muy usada para diferenciar fagos que infectan lactococos y lactobacilos.
- *Según la morfología:* mediante la microscopía electrónica se puede obtener información sobre el aspecto y las dimensiones de un determinado virus, siendo los parámetros a observar:
  - ✓ Características y tamaño de la cabeza: isométrica y/o isométrica de mayor tamaño.
  - ✓ Tipo de cola: contráctil o no, y su longitud.
  - ✓ Presencia de estructuras adicionales, tales como collar entre la cabeza y la cola, placa basal, fibras en la cola, etc.
- *Según la serología:* consiste en enfrentar las partículas fágicas a paneles de antisueros específicos y agruparlas según su capacidad de ser neutralizadas por determinados antisueros. Se observó una buena correlación de las agrupaciones serológicas con las hechas en base a la morfología, para fagos de lactococos. Esta técnica resulta interesante de ser aplicada en algunos casos donde aparecen mutantes de un fago, ya que junto con el cambio del espectro de hospedadores, cambian los perfiles serológicos.
- *Según la homología del ADN:* los estudios de hibridación ADN-ADN permiten agrupar las especies virales genéticamente relacionadas, tipificación ésta que permite desglosar los grupos morfológicos en subgrupos con similitudes a nivel molecular.



### 1.2.3.1. Fagos de *Lactococcus*

Ataques fágicos a cepas de *Lactococcus lactis* han sido documentados desde 1930, cuando Whitehead y Cox (1935) en Nueva Zelanda observaron la presencia de fagos responsables de fallas en la actividad productora de ácido de un cultivo iniciador para quesos. Desde los 70's, muchos fagos líticos han sido aislados. Inicialmente, los fagos fueron solo caracterizados taxonómicamente pero, en años recientes, muchos laboratorios han desarrollado estudios moleculares.

Actualmente los fagos de lactococos se clasifican en 10 especies, clasificación basada principalmente en homología DNA, microscopia electrónica y análisis comparativo de genoma (secuenciación) (Deveau y col., 2006). Sin embargo, solo 3 de esas especies se encuentran comúnmente en la industria láctea, denominados 936, c2 y P335 (Boucher y Moineau, 2001). Los miembros de estos 3 grupos pertenecen a la familia *Siphoviridae* (Orden Caudovirales) (Ackermann, 1999).

Los fagos de lactococos que pertenecen a la especie 936 son predominantes en Francia, Nueva Zelanda, Alemania y Canadá, mientras que los de la especie c2 fueron aislados mas frecuentemente en Rusia (Boucher y Moineau, 2001). Los miembros de la especie P335 fueron aislados mas frecuentemente en los últimos 20 años, particularmente en EEUU, Dinamarca y Nueva Zelanda (Moineau y Lévesque, 2005). Recientemente en Argentina en el Instituto de Lactología Industrial, fueron aislados 5 fagos de lactococos que se incluyeron 4 en el grupo 936 y 1 en el P335 (Suárez y col, 2008).

El rango de hospedadores de los fagos líticos es, usualmente estrecho para los de cabeza isométricas, y más amplio para los de cabeza prolata. Esto puede ser explicado a través de las diferencias observadas en la especificidad de la adsorción a cepas heterólogas y/o a los fagos de cabezas prolatas pueden evadir mejor los mecanismos de resistencia fágica bacterianos. El burst size de los fagos líticos usualmente se encuentra en el rango de 100-200 fagos por centro de infección, con períodos de latencia de 30-60 minutos, aunque fagos con burst size de 10 a 250 partículas por célula infectada, también han sido identificados. El tamaño del genoma puede variar entre 18 y 55 Kb. Al parecer, la mayoría de los fagos líticos



tienen extremos cohesivos en su ADN, indicando que una terminasa reconoce y corta el sitio *cos* durante el empaquetamiento del ADN fágico dentro de la cabeza viral (Frank y Hassan, 1998).

#### 1.2.3.2. Fagos de *Lactobacillus*

Los bacteriófagos de *Lactobacillus* fueron primeramente aislados en los 50's (Auclair y Accolas, 1983). No han sido estudiados todavía tan exhaustivamente como los fagos de lactococos, probablemente debido al hecho de que más raramente se encuentran implicados en fallas de la industria fermentativa. Estos fagos han sido primariamente aislados de fermentaciones lácticas y cárnicas. Se han reportado fagos líticos y temperados de varias especies de *Lactobacillus*. Estos fagos generalmente pertenecen a la familia *Siphoviridae* y cuentan con cabezas isométricas con colas no contráctiles. Solo unos pocos fagos con cabeza prolata han sido aislados. Los fagos de *Lb. helveticus* pertenecen a la familia *Myoviridae* y poseen ya sea largas o cortas colas contráctiles. Los fagos con cola corta resultaron ampliamente distribuidos en Francia, incluyendo a fagos líticos y temperados (Josephsen y Neve, 1998). La morfología de 2 fagos argentinos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* resultó comparable con la de los fagos de específicos de estreptococos (diámetro de cápside: 50,0 nm; cola de 180,2-250,5 nm de longitud y 5,9-7,0 nm de ancho), y puede evidenciarse la presencia de una estructura de collar, que no siempre esta presente en fagos de otras especies bacterianas (Suárez y col., 2002).

#### 1.2.3.3. Fagos de *Streptococcus*

Con el incremento en la utilización de fermentos termófilos, aumentaron consecuentemente los episodios de inhibición en la acidificación motivada por la infección de bacteriófagos, con las lógicas complicaciones que esto apareja. Pese a ello, existen muy pocos estudios sobre los fagos que lisan una de las especies más utilizadas en cultivos starters termófilos, *S. thermophilus*. Los pocos fagos conocidos de esta especie han sido aislados de elaboraciones de yogurt y quesos (Jarvis, 1989; Larbi y col., 1992 y Suárez y col., 2002).



La morfología de éstos muestra cabezas isométricas (45-60 nm) y colas largas no contráctiles, estriadas, con una longitud variable de entre 240 a 270 nm y delgadas (9-13 nm de diámetro) con pequeñas placas basales. En ninguna de éstas se observó estructuras de collar y algunos de los fagos tienen una sola fibra en la cola.

De las anteriores características morfológicas se deduce que todos los fagos estudiados pertenecen al grupo B de la clasificación de Bradley y al tipo morfológico B<sub>1</sub> de la clasificación de Ackerman (Familia *Siphoviridae*) (Neve, 1996).

Una particularidad que dificulta el estudio de los fagos infectivos de esta especie es que los mismos no forman con facilidad placas de lisis en medios agarizados, con lo que para cada sistema fago-bacteria deben ponerse a punto los medios de cultivo a usar, para permitir la correcta visualización de las placas.

Con respecto a las características de propagación de estos fagos de BAL termófilas, como son temperaturas máximas, mínimas y óptimas de replicación, se ha observado que son similares a los de la célula hospedadora. Además se ha demostrado su dependencia de los cationes divalentes, en especial Ca<sup>+2</sup>, para poder completar su lisis, determinándose que la etapa que lo requiere es aquella donde se produce la inyección del ADN fágico (Sozzi y col., 1978).

Como resultado de una reciente investigación sobre la diversidad de fagos de *S. thermophilus* presentes en el ambiente de una quesería continua en nuestro país, Quiberoni y col. (2003) determinaron que los fagos aislados podrían incluirse en 5 grupos (SI a SV), de acuerdo al espectro de hospedadores.

Los fagos de SIV mostraron el mayor rango de hospedadores, ya que 13 cepas (de un total de 20) fueron sensibles a los mismos. Por el contrario, los grupos de SIII y SV exhibieron el mas bajo rango de hospedadores, porque solo 5 cepas respectivamente fueron lisadas por ellos. Los fagos pertenecientes a los grupos SI y SII fueron capaces de lisar 7 y 8 cepas, respectivamente.



#### 1.2.4. Ciclo de vida

La infección fágica se inicia cuando entran en contacto una partícula viral y una célula sensible. En el caso de fagos y bacterias en un cultivo en suspensión, la interacción entre ambos ocurre por simple difusión, ya que partículas con el tamaño de bacterias y virus se encuentran en permanente movimiento browniano cuando están en suspensión.

Como los típicos virus, los fagos tienen que infectar la correcta u homóloga célula bacteriana hospedadora para proliferar. Inicialmente, un fago tiene que adsorberse a la célula hospedadora. Frecuentemente, la adsorción tiene una etapa reversible, seguida de una irreversible (blender-resistant). En lactococos se ha observado, a través del microscopio electrónico, que pueden ocurrir dos diferentes tipos de uniones fágicas (por ejemplo, una adsorción uniforme de muchos fagos en toda la superficie celular o una adsorción de pocos fagos en grupos, limitados a un número de receptores ubicados en la superficie celular) reflejando la presencia de diferentes distribuciones de los receptores específicos de fagos en la superficie de la célula (Josephsen y Neve, 1998).

La mayoría de los fagos se adsorben a la pared celular de las bacterias sensibles, pero algunos fagos también son capaces de adsorberse a los flagelos, vellosidades (*pili*) o cápsulas presentes en la superficie de la bacteria hospedadora. El caso mejor documentado de adsorción viral está representado por los fagos T2 y T4, los cuales son virus con morfología compleja que incluye una cabeza, cola, placa basal, espinas y fibras de la cola. El contacto inicial de estos fagos a los receptores presentes en la superficie de la bacteria ocurre por medio de los extremos distales de las fibras de la cola. Estas fibras largas que hacen la primera unión se doblan por el medio, de manera que sus extremos distales hacen contacto con la pared celular a muy corta distancia del punto medio de la partícula viral. Después de ocurrida la adhesión, la partícula viral se aproxima a la superficie de la célula. Cuando la placa basal del fago se encuentra a unos 100 Å (ångstrom=  $10^{-10}$ m) de la pared celular, se establece contacto entre las pequeñas espinas de la placa basal y la pared de la célula (Reinheimer y col., 1995) (Fig. 5).



En cepas de *L. lactis* y *Lb. casei*, algunos hidratos de carbono constituyentes de la pared celular han sido identificados como receptores fágicos. La ramnosa se mostró esencial, pero otros hidratos de carbono fueron necesarios en los sitios vecinos a la adsorción (galactosa, glucosa, o sus formas acetiladas), (Josephsen y Neve, 1998).

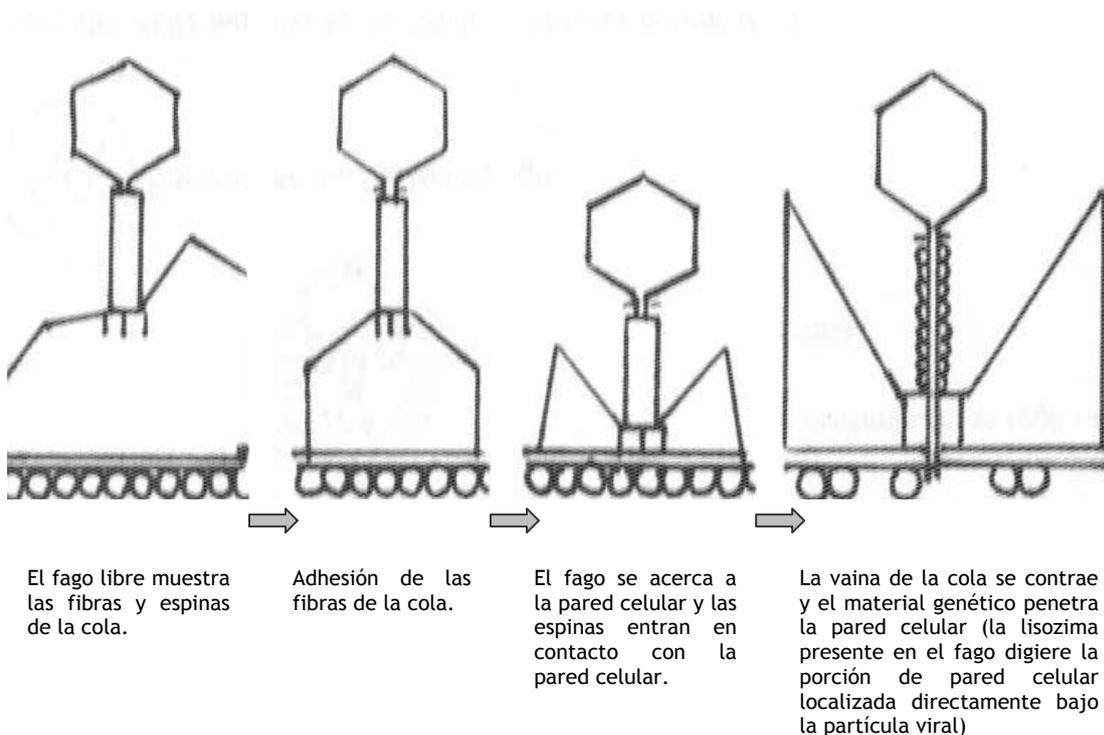


Fig. 5. Principales eventos de la adsorción del bacteriófago T4 a la pared celular bacteriana.

Luego de la primera unión reversible, el fago se adsorbe irreversiblemente a una proteína codificada cromosómicamente, situada en la membrana celular (llamada proteína de infección fágica PIP).

Mientras que la interacción de los fagos con estas proteínas es dependiente de la temperatura, la posterior inyección del ADN fágico y la traslocación a través de la membrana es muy eficiente a 30°C pero no a 4°C. Se ha sugerido también que este proceso es dependiente de la maquinaria de síntesis proteica de la bacteria hospedadora. Cationes divalentes como calcio y magnesio son indispensables para muchos fagos que infectan bacterias ácido lácticas, aunque en algunos casos se pueden proliferar en ausencia de éstos (Josephsen y Neve, 1998).



Luego de la inyección del ADN fágico en la célula, el fago puede ingresar a un ciclo lítico o a un ciclo lisogénico (Fig. 5.) (Josephsen y Neve, 1998).

#### 1.2.4.1. Ciclo lítico

Las infecciones bacterianas son causadas ya sea por fagos líticos o temperados. La infección con fagos líticos (virulentos) tiene como resultado la liberación de partículas fágicas infecciosas (viriones) al ambiente. En cambio, en el caso de un fago temperado, ocurre la incorporación de su ADN al cromosoma bacteriano, no liberándose inmediatamente para producir nuevos viriones (Frank y Hassan ,1998), (Fig. 6.).

En un ciclo lítico, el normal metabolismo de la célula infectada es suspendido por las primeras replications del ADN fágico y las proteínas fágicas. Este proceso, llamado “maduración”, finaliza con el propio ensamblado de los viriones dentro de la célula (Fig.7.).

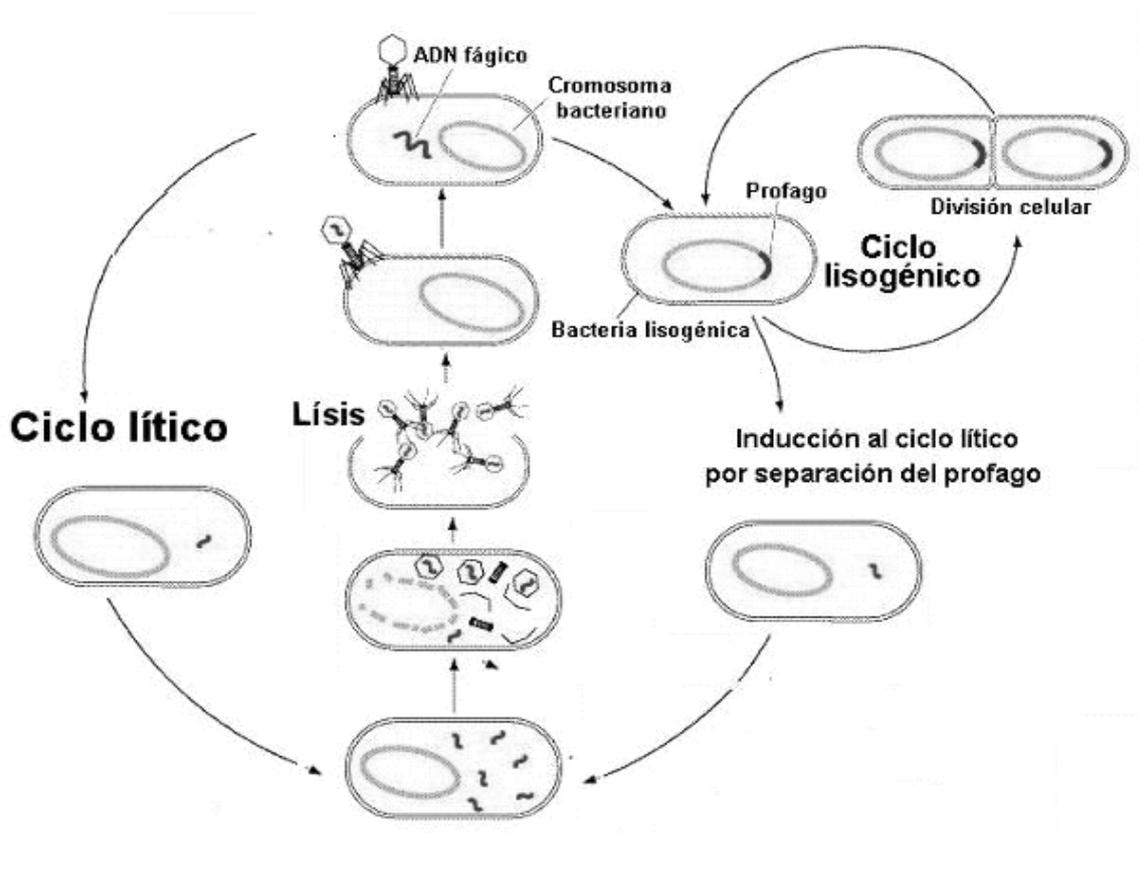


Fig. 6. Relación entre los ciclos lítico y lisogénico de un bacteriófago.

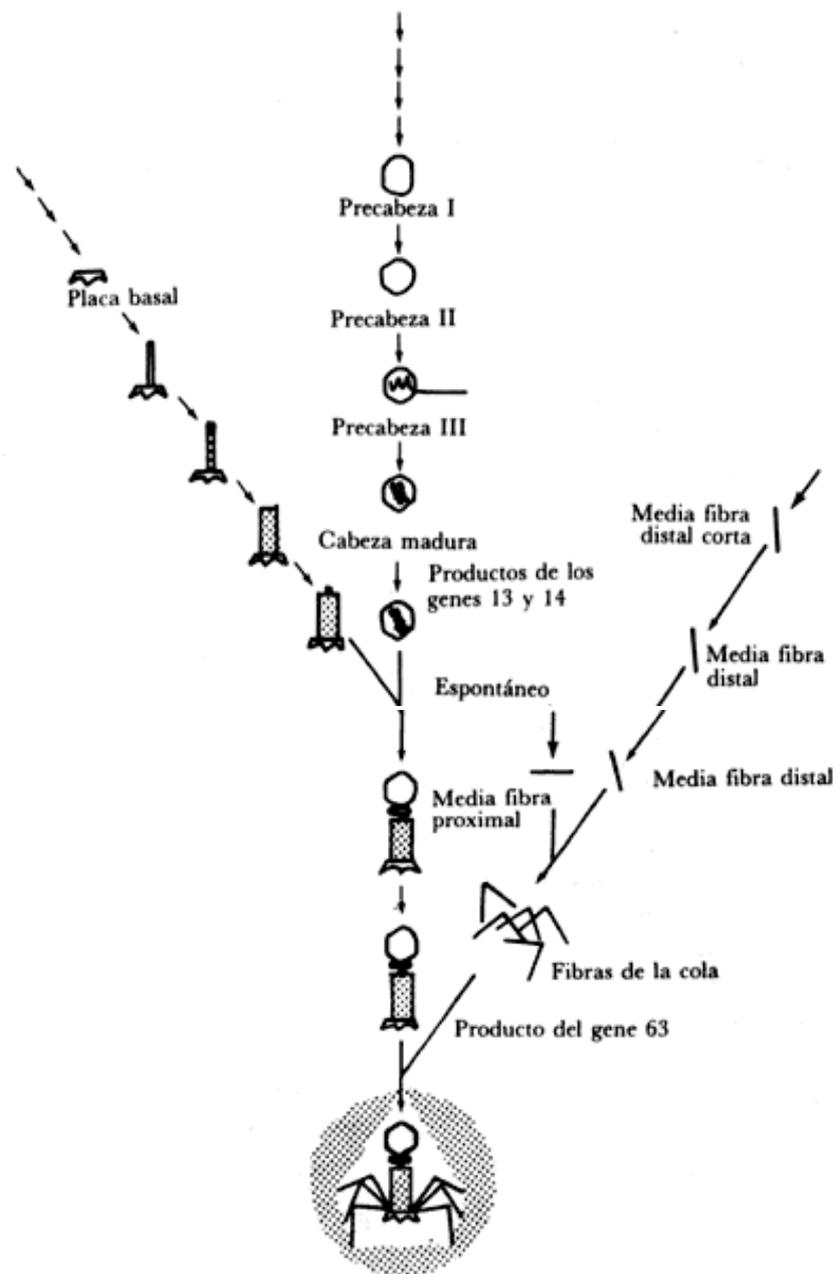


Fig. 7. Ensamblaje de un bacteriófago.



Las cabezas se unen a las colas en forma espontánea; las cuales deben estar maduras pre-requisito necesario para la adición de la cola. En contraste, las fibras de la cola no se unen espontáneamente a la placa basal. El correcto ensamblaje de muchos virus esféricos y también de algunos fagos con cabeza y cola requiere la participación de proteínas que no están presentes en el virus maduro. A estas proteínas se les conoce como proteínas formadoras del andamio. Cuando ocurre la encapsidación del ADN viral, todas las proteínas formadoras del andamio son expulsadas de la procabeza, de manera que estas proteínas quedan libres para participar en ciclos subsecuentes de ensamble de las procabezas (Anzaldo, 1995).

Finalmente, el ciclo lítico es completado cuando se lisa la célula y son liberadas las partículas fágicas infectivas al entorno (Josephsen y Neve, 1998). La lisina (proteína encargada de lisar la célula infectada) puede lisar también células no infectadas. El tiempo transcurrido desde la adsorción inicial hasta la liberación de los fagos se llama *período de latencia* y el número de partículas virulentas liberadas por célula infectada se denomina *burst size* (Josephsen y Neve, 1998).

#### 1.2.4.2. Ciclo lisogénico

No todas las infecciones producidas por fagos dan como resultado una lisis de la célula hospedadora, sino que algunos fagos que al entrar en una célula sensible inserta su ADN en el genoma de la cepa hospedadora o el ADN permanece existe en la célula bacteriana en forma libre como un plásmido (Fig. 8.). El genoma del fago o profago, se comporta como cualquier otra porción del cromosoma bacteriano y la bacteria que aloja a éste se reproduce normalmente. Este fenómeno se conoce como lisogenia o lisogenización. Ocasionalmente, el profago integrado es escindido del ADN bacteriano y se produce la multiplicación del fago y la consecuente lisis celular. Las bacterias que alojan a estos profagos se llaman lisógenas y los fagos capaces de producir la vía lisogénica, se denominan fagos lisógenos o temperados.

La frecuencia de lisogenia varía tanto con el sistema fago-hospedador, como con la multiplicidad de infección. Se sugiere que el sitio de inserción para el profago están restringido a un locus particular en el cromosoma de la bacteria aunque, ocasionalmente,



puede existir más de un sitio de unión para el mismo profago. Sin embargo, no es necesario que el profago se integre. Si no lo puede hacer, por diferentes motivos, puede existir y ser transportado en la célula en forma de moléculas circulares súper enrolladas similares a plásmidos.

Toda bacteria puede transportar, sin inconvenientes, uno o más profagos. Existen numerosos profagos defectuosos o crípticos, es decir, profagos que no contienen la información completa necesaria para su multiplicación (Josephsen y Neve, 2004).

La lisogenia esta ampliamente distribuida entre las BAL, fundamentalmente en lactococcos. El estado lisogénico en BAL es considerado la principal fuente de fagos en los ambientes industriales. Los fagos temperados pueden perturbar los procesos fermentativos cuando, por mutación, se transforman en virulentos y son capaces de sobreinfectar la cepa que los originó. También, los fagos liberados pueden ser líticos para otras cepas constituyentes del starter, infectándolas. Por último, la liberación de los fagos temperados provoca la lisis de la cepa lisógena deteniendo su actividad (Davidson y col., 1990). Las consecuencias desfavorables de este proceso son mas evidentes en starters conformados con bajo número de cepas. La mayoría de las cepas lisógenas pueden ser inducidas por radiaciones UV o tratamientos con Mitomicina C, aunque estas no son frecuentemente fáciles de identificar.

El primer trabajo que confirma la existencia de cepas lisógenas de BAL fue realizado por Reiter en 1949 (Coetzee y de Klerk, 1962). El demostró que *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* HP era una cepa indicadora para bacteriófagos inducidos a partir de 3 cepas de *L. lactis* y acentuó su atención en la necesidad de evitar el uso en fermentaciones de starters mixtos que contengan ambos tipos de cepas (lisogénicas y de cepas indicadoras de fagos temperados).

Mientras que la mayor atención de los microbiólogos en el campo lácteo ha sido centrarse en los fagos líticos, desde el descubrimiento de Reiter se puso mas énfasis sobre fagos temperados. Esto en parte ha sido inspirado por la posibilidad de que los fagos temperados puedan tener efectos nocivos en fermentaciones industriales.

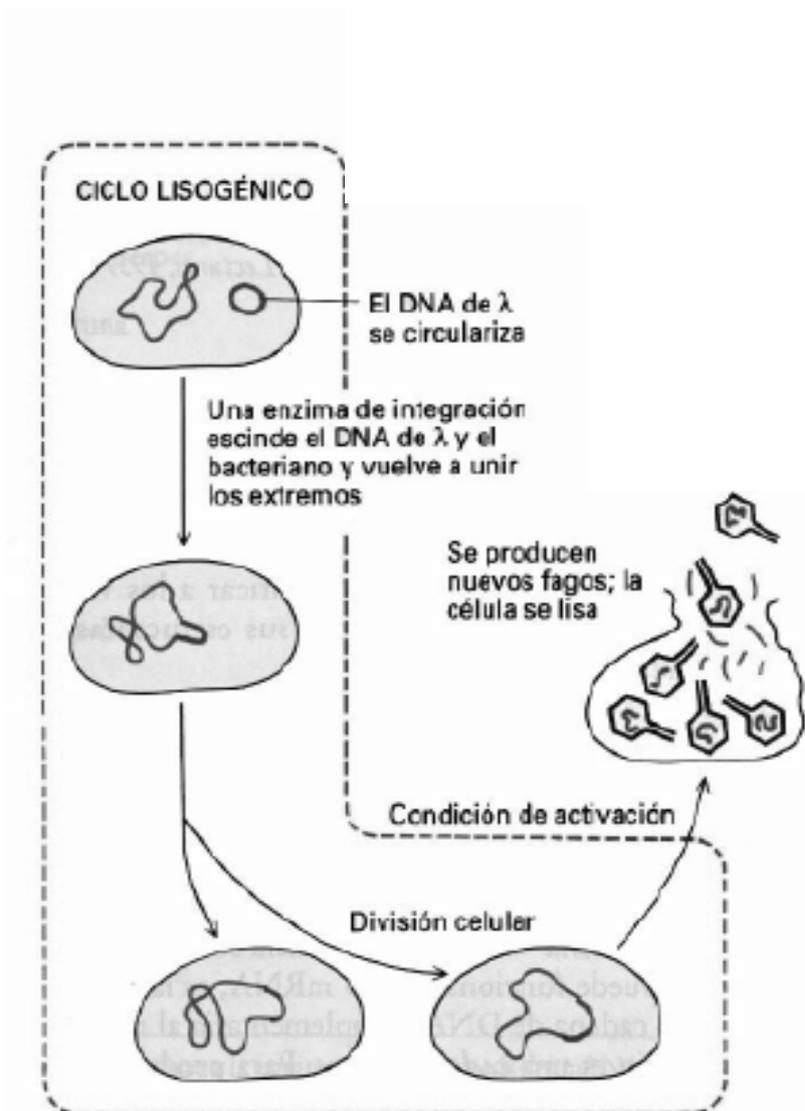


Fig. 8. Ciclo lisogénico de un bacteriófago.



Desde un punto de vista práctico, el estudio de la lisogenia en BAL es de enorme interés ya que las cepas lisogénicas son un reservorio de fagos líticos en plantas lácteas (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). La lisogenia está ampliamente difundida en lactococos y lactobacilos, y varios estudios han demostrado altas frecuencias de cepas lisogénicas (Sechaud y col., 1988 y 1992; Davidson y col., 1990; Carminati y col., 1997; Josephsen y Neve, 1998 y Zago y col., 2007).

Aparentemente, la lisogenia es menos común en *S. thermophilus*. Carminati y Giraffa, (1993) examinaron 45 cepas y solo una fue inducible por Mitomicina C.

La lisogenia en el género *Lactobacillus* fue por primera vez descrita por Coetzee y de Klerk (1962), quienes indujeron 343 cepas de Lactobacilos (de 7 especies) a rayos UV, identificando 2 cepas lisógenas. Así mismo, 80 cepas fueron examinadas en estudios posteriores demostrándose que los cultivos sobrenadantes de 16 cepas inhibieron el crecimiento de otras, y observándose partículas fágicas en 8 de las 16 sobrenadantes. Mayores frecuencias de lisogenia pueden observarse cuando se utiliza Mitomicina C para la inducción (Coetzee y de Klerk, 1962). En *Lb. helveticus*, el rango de cepas inducibles puede variar entre el 10% y el 80% de las mismas, pero aún cuando el porcentaje sea alto, no todas liberan fagos completos (funcionales) (Carminatti y col., 1997). Para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Zago y col. (2007) demostraron que el 60 % de las cepas estudiadas fueron inducibles. Basándose en estos estudios se puede concluir que la lisogenia es muy común en lactobacilos. Con algunas excepciones, los fagos temperados de *Lactobacillus* son de cabeza isométrica. Los diámetros de las cabezas varían desde 56-78 nm y las longitudes de cola de 120-182 nm salvo en aquellos con colas mas largas. También se ha notado collares, placas basales y fibras de la cola (Coetzee y de Klerk, 1962).

#### 1.2.4.3. Pseudolisogenia

La pseudolisogenia se presenta cuando un cultivo de bacterias acarrea fagos líticos mientras se mantiene activa la población celular. El cultivo se mantiene activo porque solo una porción del total de la población es sensible a los fagos y la otra parte del cultivo mantiene la habilidad para crecer rápidamente y producir ácido. El establecimiento de la



pseudolisogenia depende de la habilidad del cultivo para producir variantes con diferentes grados y tipos de sensibilidad fágica. A diferencia de la verdadera lisogenia, los fagos pueden ser eliminados del cultivo pseudolisogénico creciendo en presencia de anticuerpos fágicos específicos o a través de purificaciones repetidas (selección de colonias aisladas de placas de agar), (Frank y Hassan, 1998).

#### 1.2.5 Mecanismos nativos de fagorresistencia

Durante la co-evolución de bacteriófagos y bacterias, éstas últimas han desarrollado varios sistemas de defensa contra los primeros. Estos mecanismos de resistencia fágica pueden ser efectivos en cualquiera de las fases del ciclo vital del bacteriófago. Las BAL vienen siendo usadas en fermentaciones alimenticias por años y en consecuencia también han estado expuestas a fagos. Los mecanismos de resistencia a fagos, naturalmente presentes en células bacterianas, son: interferencia en la adsorción, bloqueo en la inyección del ADN, sistemas de restricción/modificación y finalmente, infección abortiva (Fig.9.).

En el género *Lactococcus*, estos mecanismos están con frecuencia localizados en plásmidos (pequeñas moléculas de ADN, que se replican con independencia de los cromosomas bacterianos). Los plásmidos pueden transmitirse de célula a célula por medio de un mecanismo denominado conjugación. Ello permite la transferencia de los mecanismos de resistencia dentro de una población celular (Chr. Hansen ,1998).

##### 1.2.5.1 Interferencia en la etapa de adsorción

La primera etapa dentro del ciclo de infección fágica es la adsorción, en la cual el fago reconoce y se une al receptor ubicado en la pared de la célula sensible. Sin embargo, existen células que tienen disminuida su tasa de adsorción fágica, lo cual disminuye o elimina la posibilidad de una infección fágica.

Se ha demostrado que estas células resistentes contienen cambios en la estructura de los receptores fágicos. El cambio por lo general es mínimo, pero suficiente para evitar la adsorción. Estas modificaciones pueden tener varios orígenes (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994 y Josephsen y Neve, 2004):

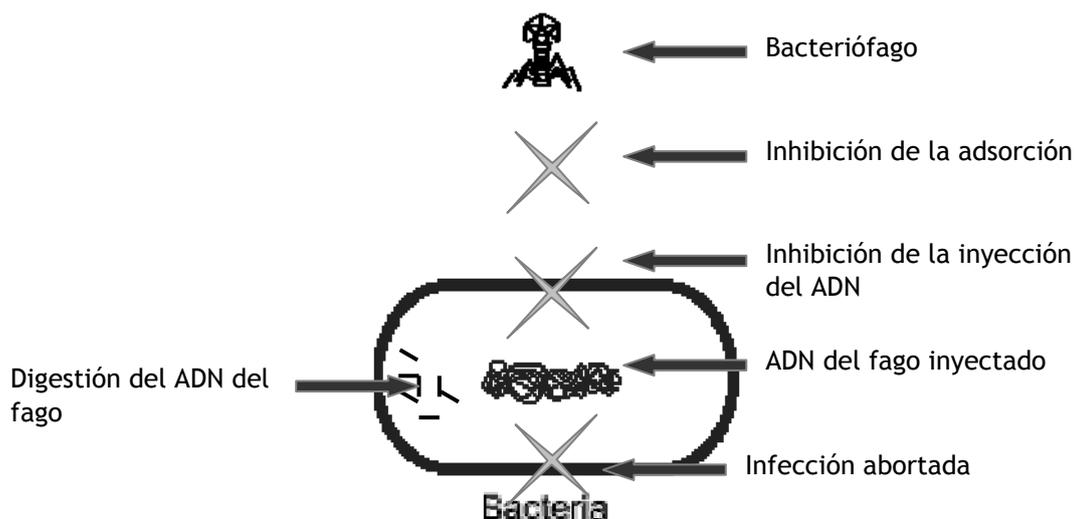


Fig. 9. Mecanismos de resistencia fágica en una célula bacteriana ( Ch. Hansen. 1998).

- ✓ Mutaciones espontáneas puntuales (sustituciones o inserciones) en el cromosoma bacteriano (el receptor no se sintetiza o se sintetiza menos).
- ✓ Presencia de plásmidos cuya expresión deriva en cambios estructurales tales como enmarascamiento parcial o total del receptor.
- ✓ Presencia de plásmidos que transportan información para conferir resistencia fágica.

Se han identificado varios plásmidos que codifican mecanismos de resistencia ligados a interferencia en la adsorción fágica en lactococos. Algunos de ellos se muestran en la Tabla 5 (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Tabla 5. Plásmidos de lactococos responsables de interferir en la adsorción fágica (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

PLÁSMIDO	TAMAÑO	HOSPEDADORES ORIGINALES
pME0030	48 kb	<i>L. lactis ME2</i>
pSK112	54kb	<i>L. cremoris SK11</i>
pC1528	46kb	<i>L. lactis UC503</i>
pKC50	80kb	<i>L. lactis 57150</i>



#### 1.2.5.2 Bloqueo de la inyección del ADN viral

Un atípico mecanismo de fagorresistencia ha sido descrito en muchas instancias. Se trata del bloqueo de la inyección del ADN fágico. En estos casos, la adsorción es aparentemente normal, pero el ADN fágico no es introducido en la célula bacteriana y la infección se detiene. Es muy probable que esto represente un caso de inhibición de la adsorción, en el cual se inhibe la adsorción irreversible que permite que la inyección fágica ocurra (Coffey y Ross, 2002).

Watanabe y col (1984), sugirieron la existencia de dos tipos de adsorción, la irreversible, la cual conduce a la infección y la reversible, la cual no la asegura. Los autores aislaron un mutante de *Lb. casei*, el cual permitía la adsorción del fago PL-1 a niveles normales pero no permitía la inyección del ADN viral. Observaciones microscópicas revelaron partículas fágicas adsorbidas a las células, pero no evidenciaron la inyección del ADN ya que no pudieron ser encontradas cabezas fágicas vacías (Hill, 1993).

Valyasevi y col. (1973), describieron una variante resistente de *L. lactis* subsp. *lactis* C2, la cual dificultaba al fago c2 su normal actividad. Esta inactivación fágica estaba vinculada a la presencia de una proteína de membrana huésped específica denominada 32-MDA, la cual se supone se encuentra involucrada en la infección fágica. Esto sugiere que la adsorción observada del fago c2 a la variante resistente fue un tipo de mecanismo que no permite que el ADN fágico gane acceso al citoplasma celular (Hill, 1993).

Mc Grath y col. (2002), informaron sobre un nuevo sistema de fagorresistencia que se manifiesta con el bloqueo de la inyección del ADN viral y representa un nuevo mecanismo de exclusión de la superinfección. Este mecanismo está ligado a un gen profágico llamado sic2009. La proteína SIC2009 esta asociada a la membrana celular y su expresión no afecta la adsorción, la transfección ni transformación fágica por plásmidos, pero sí interfiere en la transducción por éstos y en la replicación fágica. Esto fue considerado como la primera descripción de un mecanismo de bloqueo de superinfección exclusión/inyección codificado en un fago que se da en el género *Lactococcus* (Coffey y Ross, 2002).



Estudios de la inhibición de la adsorción y bloqueo de la inyección fágica tienen una importancia considerable ya que estos constituyen las dos primeras líneas de defensa, con las cuales una cepa bacteriana puede prevenirse o protegerse de la infección fágica (Hill, 1993).

#### 1.2.5.3 Restricción/Modificación (R/M)

En estos casos, luego de una exitosa adsorción e inyección fágica del genoma dentro de la célula, la bacteria activa endonucleasas de restricción y metilasas de modificación. Las primeras reconocen el ADN invasor como extraño y lo degradan. Los sistemas R/M son relativamente débiles, y a veces el ADN fágico escapa a la restricción, metilándose a través de las metilasas, y luego se replica y produce una progenie modificada la cual ya no es sensible frente a ese fago. En consecuencia, mientras los sistemas de R/M pueden proveer de una formidable barrera a la infección a través de fagos no-modificados, la asociación de metilasas modificadas también puede proveer suficientes oportunidades para la adaptación de una población fágica que no será reprimida por mucho tiempo por acción de las endonucleasas de restricción. Recientes estudios han demostrado que los sistemas R/M son enteramente efectivos como sistema de defensa cuando son combinados con otros mecanismos de resistencia complementarios. El accionar de los sistemas R/M en lactococos pueden actuar como barrera a la transformación de ADN en el citoplasma y la transferencia de plásmidos vía conjugación. No obstante, la presencia y accionar de los mecanismos nativos de R/M deberían ser tenidos en cuenta como posibles causas si la introducción y expresión de genes particulares en cepas industriales se vuelve dificultoso. Los sistemas R/M son responsables de la reducción en el E.O.P (Eficiencia en el plaqueo), principalmente en cepas de lactococos, muchas de las cuales contienen una combinación de sistemas de R/M de diferentes especificidad o con otros mecanismos de resistencia, incrementando el nivel de resistencia fágica (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Josephsen y Neve, 2004).

El mecanismo intracelular de restricción/modificación (R/M) constituye una herramienta de defensa de las bacterias contra los ataques fágicos, pero al mismo tiempo genera una progenie fágica con características diferentes a las del fago original y resistente al sistema que les dio origen (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).



Se conocen 3 tipos de sistemas R/M, denominados I, II y III. Estos sistemas se diferencian en la organización de sus genes, en los co-factores necesarios para la acción de las enzimas, en la naturaleza de las secuencias “target” y en la posición de los sitios de corte de la enzima de restricción. Los sistemas Tipo I son genes multifuncionales, constituidos por tres genes estructurales (denominados *hsdR*, *hsdM* y *hsdS*) que codifican para la enzima de restricción, la de modificación y la especificidad (sitio de reconocimiento) de ambas, respectivamente. A su vez, los sistemas Tipo I se clasifican en familias (A, B, C y D), por homología entre genes y ensayos serológicos de los extractos celulares. La homología entre genes de distintas familias no supera el 30% (Bickle y Krüger, 1993; Murray, 2000). Los sistemas del Tipo II, normalmente poseen simples requerimientos de co-factores y de organización molecular y sitios de corte en o cerca de los lados de reconocimiento. En general los sistemas tipo II están constituidos de dos genes estructurales, una endonucleasa (ENase) y una metiltransferasa (MTase). La gran mayoría de los sistemas R/M presentes en las BAL son del tipo II. El sistema Tipo III requiere la presencia dos sitios de reconocimiento asimétricamente orientados de manera inversa donde el corte ocurre aproximadamente a los 25 nucleótidos de uno de los lados de la secuencia de reconocimiento. Este tipo de sistema requiere de manera absoluta  $Mg^{2+}$  y ATP y es estimulado por Adomet. Una de las características distintivas del tipo III radica en que la metilación toma lugar solo en uno de las hebras del ADN, originando moléculas hermanas donde solo la mitad de los sitios son modificados luego de la replicación. De todas maneras, desde que ocurre el corte solo si la otra hebra es modificada, la protección de la hebra naciente es preservada (Forde y Fitzgerald, 1999).

#### 1.2.5.4 Infección abortiva (Abi)

Cuando está presente este mecanismo los fagos son adsorbidos a la célula hospedadora, inyectan su genoma dentro de la célula sin ser fragmentados por la actividad de un sistema R/M y, normalmente el desarrollo intracelular subsiguiente es normal (replicación del ADN, transcripción, translocación, empaque del ADN, ensamble de la progenie fágica), Sin embargo, ésta es la última oportunidad para el hospedador de combatir el ataque fágico.



Como la maduración de los fagos dentro de la célula causa degradación de su cromosoma, la muerte de una significativa proporción de la población celular, ocurrirá. La infección aborta en los últimos estadios y los fagos permanecen atrapados en la célula hospedadora, no siendo liberados al ambiente (Josephsen y Neve, 1998). Este sistema de insensibilidad fágica es detectado a través de:

- ✓ la ausencia completa de placas de lisis sobre un cultivo de la cepa
- ✓ una severa reducción en el tamaño de las placas de lisis
- ✓ un descenso en la eficiencia del plaqueo (EOP)

Los sistemas Abi están frecuentemente combinados en cepas aisladas de lactococos con sistemas R/M complementarios, inhibición de la absorción o interferencia de la inyección fágica. Por otra parte, más de un sistema Abi puede estar presente en una cepa. Los sistemas Abi fueron originariamente designados con el nombre de sistemas “Hsp”, demostrando su sensibilidad térmica. Así, mientras el sistema está activo a bajas temperaturas (30°C), se vuelve significativamente lábil a más altas temperaturas (40°C). En contraste, los mecanismos de resistencia fágica pueden volverse más activos a altas temperaturas en *S. thermophilus* (Josephsen y Neve, 2004).

#### 1.2.5.5 Inmunidad lisogénica

Las bacterias lisogénicas son inmunes a la infección con partículas fágicas del mismo tipo que su profago (o íntimamente relacionados). Esta inmunidad no impide la fijación de las partículas del fago atenuado a la superficie bacteriana. Cuando esto ocurre, el material del nuevo fago infectante, que ha sido inyectado en la célula, no se replica sino que permanece aislado y es transmitido a una de las dos células hijas en las sucesivas divisiones bacterianas. Por lo tanto, la inmunidad evita que el fago atenuado infectante entre en un ciclo lítico. Es muy poca la información referida a la base molecular y genética que controla y mantiene la lisogenia en las bacterias lácticas, pero se sabe que sigue patrones similares a los que se encontraron para el fago de *E. coli*.



La importancia práctica de la lisogenia radica en que las bacterias que transportan un profago podrían, inducción mediante, resultar una fuente de fagos líticos, actuando así como un reservorio de los mismos (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994; Moineau y Lévesque, 2005).

Se sabe que la lisogenia es muy frecuente en lactococos, común en lactobacilos pero es prácticamente inexistente en *S. thermophilus*, habiéndose revelado en muy pocos casos (Sleytr y col.,1993; Carminati y Giraffa,1993; Neve, 1996; Zago y col., 2007).

#### 1.2.6 Prevención de la infección fágica

Los bacteriófagos son todavía la causa más común del fracaso en la acidificación por bacterias lácticas en los procesos fermentativos industriales (especialmente quesería y producción de leches fermentadas) (Neve, 1996; Moineau, 1999; Suárez y col., 2002). La acidificación disminuye su velocidad en los comienzos del proceso de fabricación, pero las cepas no atacadas pueden crecer y continuar la acidificación. En situaciones de severo ataque fágico, la acidificación puede llegar a paralizarse por completo, con las consecuentes pérdidas económicas (Josephsen y Neve, 1998; Forde y Fitzgerald ,1999).

El único método que aseguraría totalmente un ambiente libre de fagos es la esterilización del equipo, leche y aire. En la industria esto es imposible pero un cierto número de precauciones puede evitar la dispersión de fagos y permitir una acidificación satisfactoria de la leche.

##### 1.2.6.1 Medios inhibidores de fagos

El crecimiento fágico durante la producción de cultivos starters puede ser controlado a través del uso de medios inhibidores. Estos medios cuentan con sales (fosfatos y citratos) las cuales secuestran los iones calcio, inhibiendo así la propagación de fagos que usan ese catión. Sin embargo, los agentes quelantes pueden, en algunos casos, retrasar el crecimiento de los cultivos iniciadores. Estos medios suelen contener suero deionizado, proteínas hidrolizadas, fosfatos de sodio y amonio, citratos y estimulantes del crecimiento, como extracto de levadura. Los medios comerciales para inhibición fágica varían ampliamente en su habilidad



para prevenirla. Los más efectivos contienen suficientes nutrientes para vencer la inhibición natural del medio y citratos como buffer. Debido a que no todos los bacteriófagos son inhibidos por ausencia de calcio; por lo tanto, para ser efectivos, estos medios de cultivo deben ser usados solo como parte de una estrategia global de control fágico (Frank y Hassan ,1998; Josephsen y Neve, 2004).

#### 1.2.6.2 Uso de cultivos fagorresistentes

Las BAL varían ampliamente en cuanto a su susceptibilidad frente a la infección fágica. Por lo tanto, el uso de cepas resistentes es un importante aspecto del control fágico. Las cepas fagorresistentes han sido aisladas de cultivos que mantienen su actividad aún en presencia de altos niveles de infección fágica. Las cepas pueden también ser genéticamente modificadas a través del agregado de plásmidos codificantes de fagorresistencia.

Las variantes fagorresistentes pueden ser seleccionadas a través de la exposición de las cepas a sueros industriales con fagos presentes durante la manufactura quesera. Las variantes resistentes son testeadas en cuanto a que deben conservar una producción ácida rápida para poder ser agregadas al esquema de rotación usado en la fábrica. El uso de estos tipos de sistemas requiere un monitoreo diario de los fagos en el suero, pero permite el uso de una simple mezcla de 5 o 6 cepas definidas por un largo tiempo.

Se ha visto que cepas proteasa-negativas de lactococos son resistentes a la infección fágica debido a sus niveles de crecimiento lento. En este caso, una mayor concentración celular debe ser usada para compensar la escasez de crecimiento durante el proceso de fabricación. Estas variantes ofrecen otras ventajas, como sensibilidad baja a antibióticos, y a la temperatura (permitiendo el uso de altas temperaturas de cocción) (Frank y Hassan, 1998; Josephsen y Neve, 2004).

#### 1.2.6.3 Rotación de cultivos

La rotación de cultivos controla la infección de bacteriófagos limitando la duración de la exposición de cepas específicas o una mezcla de cepas a un determinado fago. Si se utiliza, para conducir una fermentación, un cultivo iniciador con varias cepas no relacionadas en la



sensibilidad a fagos (generalmente 3 o 4), se reduce la probabilidad de que se frene la acidificación por una infección. De este modo, si durante una elaboración una cepa es atacada, el resto puede continuar la acidificación. Los cultivos pueden ser rotados diariamente o con una frecuencia mayor.

La rotación de cultivos no elimina el crecimiento fágico en las tinas con leche destinada la producción quesera, pero si el número de fagos es mantenido por debajo de 10.000 UFP por ml de suero, la producción de ácido no es sensiblemente afectada. El éxito en la rotación de cultivos está limitado por la eficacia de las cepas usadas en cuanto a mantener una capacidad de fermentación aceptable. En adición, usar muchas cepas diferentes puede dar como resultado una falta de uniformidad del producto.

Nuevos tipos de sistemas de rotación de cultivos han sido diseñado por Sing y Klaenhammer (1993), y Durmaz y Klaenhammer (1995). Estos sistemas usan derivados genéticos de una sola cepa, con diferentes mecanismos de fagorresistencia. Cuando es usado en rotación o como mezclas, los fagos resistentes dejan de desarrollar, por lo que no pueden vencer los múltiples mecanismos de defensa. Este tipo de rotación evita las pérdidas en la uniformidad del producto asociados con las rotaciones de cultivos convencionales y permite usos continuos de cepas con propiedades especiales (Frank y Hassan, 1998; Josephsen y Neve, 2004).

#### 1.2.6.4 Cultivos de inoculación directa (DVS)

Los cultivos concentrados que se inoculan directamente en la tina de elaboración son una alternativa interesante que minimiza el riesgo de infección fágica. Estos cultivos concentrados congelados se mantienen entre  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-96^{\circ}\text{C}$ , lo que dificulta y encarece el costo de distribución y almacenamiento. Otra opción son los cultivos liofilizados. La inoculación directa a la tina de elaboración brinda una notable seguridad, ya que como el desarrollo de los fagos requiere células en etapa de multiplicación activa, una reducción en el número de repiques en la propagación reduce el número de generaciones del cultivo y, consecuentemente, el paralelo aumento en el nivel de bacteriófagos que se propagan sobre dichas células. Este tipo de starter tiene como desventaja la necesidad de un mayor tiempo



para alcanzar los niveles de acidificación requeridos por una determinada elaboración, debido a que las células componentes manifiestan un mayor tiempo en la fase lag, de entre 30 a 60 minutos (Klaenhammer, 1984 ; Quiberoni, 1997).

Los riesgos de accidentes por fagos son mayores cuando se utilizan cultivos de inoculación semidirecta, ya que en la preparación de este tipo de fermentos se requiere una propagación celular previa. Así, en el caso de existir un fago en la etapa de preparación del fermento, aún cuando sea en muy bajo número, durante la multiplicación de las bacterias del fermento, existe una propagación “silenciosa”, ya que el número de fagos puede ser aún insuficiente como para producir una manifestación visible en el desarrollo de acidez. Luego, al ser adicionado el fermento a la tina de elaboración, en las nuevas fases de multiplicación de las cepas que constituyen el fermento, el fago alcanza títulos líticos que reducen o detienen el proceso de acidificación (Peitersen y col., 1991 ; Everson, 1991; Frank y Hassan, 1998).

#### 1.2.6.5 Mutantes espontáneos fagorresistentes

Inmediatamente luego del descubrimiento de los bacteriófagos surgió como la solución más simple al problema, el aislamiento de las variantes que habían resultado inmunes al ataque (mutantes espontáneas fagorresistentes). No obstante, luego se comprobó que las cepas viables aisladas de cultivos que habían sido lisados por un fago determinado podían resultar sensibles a nuevos fagos, perdían gradualmente la resistencia al fago lítico original o tenían menos capacidad acidificante que la cepa madre. En general, la utilización de una cepa resistente a un determinado fago provee protección sólo por un corto período de tiempo, tras el cual se torna sensible al fago. Existen algunos casos atípicos donde la resistencia se mantuvo por meses (Klaenhammer, 1984). En los últimos años, investigadores del INLAIN (FIQ-UNL) lograron aislar mutantes espontáneos con alta resistencia fágica y adecuadas propiedades tecnológicas a partir de cepas de *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999), *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 1999; Guglielmotti y col., 2006) y *S. thermophilus* (Binetti y col., 2007).



#### 1.2.6.6 Cepas insensibles a fagos

Los mutantes fagorresistentes surgen en forma espontánea mediante alteraciones celulares que previenen la adsorción, infección o replicación de un fago o grupo de fagos relacionados. También resultan particularmente interesante los casos de algunas cepas de lactococos que en forma recurrente soportan el ataque de todos los fagos conocidos y mantienen su resistencia por largo tiempo bajo las mas devastadoras condiciones de elaboración. La longevidad de estas cepas parece estar determinada por las condiciones ambientales de la planta en la que se encuentra un determinado fago y por propiedades de fagorresistencia intrínseca de dichas cepas. De hecho, se podría hablar de una presión de selección, donde los fagos de un determinado ambiente van eliminando las cepas que son sensibles a ello; permaneciendo en determinado hábitat solo aquellas que adquieran algún tipo de mecanismo de fagorresistencia (Klaenhammer, 1984; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).



### 1.3 HETEROGENEIDAD CELULAR EN BACTERIAS LÁCTICAS

---

La variación individual en el ámbito de una especie es la condición indispensable para que ésta pueda evolucionar y diferenciarse. En efecto, la variación permite la acción de las fuerzas selectivas. Cada especie está dividida en diversas variedades o poblaciones locales, es decir, en grupos de individuos que habitan espacios limitados del área total sobre la que está distribuida la especie. Una población, aún presentando una serie de características morfológicas y funcionales (fenotipos) homogéneas en conjunto, muestra una apreciable variabilidad individual, en parte sostenida genéticamente y en parte derivada de la acción ambiental.

Las causas de la variación en las poblaciones naturales han de buscarse esencialmente en la diversa constitución genética (genotipo) de cada individuo y en la influencia que las diversas condiciones ambientales ejercen en la manifestación de los caracteres hereditarios. Todo ser vivo es siempre el resultado de la interacción entre su patrimonio genético y el ambiente en el que vive. Por ello cabe distinguir, en las poblaciones, una *variación fenotípica*, debida al cambio de las condiciones ambientales, y una *variación genotípica*, heredable, directamente expresada por el patrimonio genético (Solomon y col., 1987).

En general, una gran población de bacterias posee un alto porcentaje de variabilidad, capaz de entrar en acción en respuesta directa a cambios en las condiciones ambientales. A causa del tiempo de generación extremadamente corto y de la gran dimensión de la población, los organismos haploides poseen una probabilidad de variación latente.

En la práctica, esto significa que ningún cultivo de bacterias es genéticamente puro. Un ligero cambio en el medio de cultivo puede volverse selectivo y provocar una completa modificación de la población durante las sucesivas transformaciones (Stainer y col., 1993). Las mutaciones son cambios heredables en el genoma. Algunas mutaciones causan cambios en las características fenotípicas y la ocurrencia de estas mutaciones puede ser inferida a partir de los efectos que producen. Estas cepas que sufren mutaciones se llaman “cepas salvajes” y los descendientes que tienen mutaciones en sus genomas son llamadas “mutantes”. Así, los



mutantes son caracterizados por las diferencias inherentes entre ellas y sus ancestros salvajes (Randall y col, 1984). En lo que a las BAL respecta, la heterogeneidad celular, puede deberse a:

- ✓ cambios en las condiciones ambientales de crecimiento (presencia o ausencia de factores de crecimiento, cambios de temperatura, cambios en tensión de oxígeno, concentración de cationes divalentes, etc.)
- ✓ presencia de plásmidos
- ✓ variantes espontáneas estables con características fenotípicas particulares (Stainer y col.,1993).

Deibel y col. (1956), citaron algunas de las condiciones ambientales que interfieren en la división celular de una cepa de *Lactobacillus leichmannii*, dando como resultado formas filamentosas. Entre estas condiciones aparecen las temperaturas extremas de crecimiento, baja tensión superficial, antibióticos, deficiencias de iones metálicos, irradiación y composición del medio de cultivo. Los autores observaron que la cepa tiene una morfología normal cuando crece en un medio complejo conteniendo vitamina B<sub>12</sub>, pero cuando es cultivada en un medio sintético en el cual ésta es reemplazada por tiamina, las formas filamentosas se vuelven predominantes (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de diferentes niveles de vitamina B<sub>12</sub> y tiamina en la morfología de *Lb. leichmannii* (Deibel y col, 1956).

SUPLEMENTO mµg/ml Vitamina B <sub>12</sub>	CRECIMIENTO	MORFOLOGIA
0.02	++	Filamentos
0.50	+++++	Bacilos normales
SUPLEMENTO mg/ml Tiamina	CRECIMIENTO	MORFOLOGIA
0.5	++++	Filamentos
5.0	+++++	Bacilos normales



Estos resultados obtenidos con tiamina se corresponden con los de Jeener y Jeener (Deibel y col., 1956), quienes observaron que *Lb. acidophilus* R26 tiene una morfología bacilar cuando crece en medios con bajos niveles de desoxirribosa y posee una morfología normal cuando los niveles de ésta son elevados. De cualquier manera, la presencia de óptimas cantidades de vitamina B<sub>12</sub> en el medio no derivó a formas bacilares en *Lb. acidophilus*, cuando los niveles de desoxirribosa fueron bajos.

Asimismo, Holden y Holman (1957) examinaron de manera microscópica a *Lb. arabinosus* 17-5, llegando a la conclusión de que las cepas recolectadas de un medio deficiente en vitamina B<sub>6</sub> son morfológicamente diferentes de las células bacilares normalmente encontradas en cultivos con adecuadas concentraciones de vitamina. Las células de *Lb. arabinosus* obtenidas de un medio suplementado con vitamina B<sub>6</sub> poseen variaciones en la longitud celular debidas probablemente a divisiones celulares incompletas, observándose células en forma de cocos, características del organismo. Sucesivos pasajes a medios con deficiente contenido de vitamina B<sub>6</sub>, dan por resultado un menor desarrollo, obteniéndose formas celulares anormales. Muchas de las células tienen formas ovales y turgentes mientras que las células alargadas y turgentes son encontradas ocasionalmente. La participación de la vitamina B<sub>6</sub> en el metabolismo de los aminoácidos de configuración L y D, y la reciente demostración de que aminoácidos de ambas configuraciones están presentes en las paredes celulares de los organismos en cuestión, sugieren una posible base metabólica para la obtención de cambios en las células de las paredes en aquellas células deficientes en vitamina B<sub>6</sub>.

Vescovo y col. (1990) describieron el aislamiento de dos variantes morfológicas a nivel de colonia de *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* LB6, llegando a la conclusión de que las concentraciones de cationes divalentes como calcio y magnesio influyen en la velocidad de desarrollo y la morfología, aumentando el crecimiento de las dos variantes en medio líquido, y que el manganeso no produce este efecto.

La presencia de plásmidos en *L. lactis* subsp. *cremoris* M12R parece tener gran importancia en la fisiología de esta cepa, influyendo el transporte y metabolismo de lactosa, galactosa y sacarosa, la actividad proteolítica, el uso del citrato para la obtención de



diacetilo, y en varios mecanismos de defensa fágicos ( R/M y reducción de la adsorción). Debido a que los plásmidos son altamente inestables en las células bacterianas, los vínculos plasmidiales pueden perderse espontáneamente en células individuales inducidas en cultivos puros de estreptococos lácticos. Se ha sugerido que la acumulación de variantes en la población puede ser debida a los cambios en el ADN plasmidial (Stenson y Khaenhammer,1986).

La heterogeneidad celular de cultivos de lactococos fue estudiada en lo referente a la producción de ácido y sensibilidad fágica por Limsowtin y col. (1978). En todas las cepas encontraron variantes con baja capacidad acidificante, dependiendo del medio de cultivo utilizado. En caldo M17, estas variantes aparecieron más frecuentemente que en leche.

Reinheimer y col. (1995) observaron que la heterogeneidad celular puede no estar ligada a variaciones en el ADN plasmidial, lo cual fue previamente observado para *S.thermophilus*. La heterogeneidad celular de *Lb. helveticus* ATCC 15807, no debida a cambios en el ADN plasmidial, permitió aislar variantes espontáneas estables con características tecnológicas particulares. Por otro lado, se observó que la heterogénea distribución de la actividad caseinolítica en las células de esta cepa muestra la existencia de una baja proporción de clones con una elevada actividad en comparación con la cepa madre. Las variantes de este tipo tienen una gran importancia tecnológica, ya que la actividad proteolítica es esencial para el crecimiento de las BAL en leche, así como para la maduración de quesos. Pero aun más importante resultó la posibilidad de aislar variantes estables con dos fenotipos de importancia práctica: elevada actividad caseinolítica y resistencia fágica.

La heterogeneidad celular en bacterias lácticas resulta muy interesante de estudiar ya que abre la posibilidad de obtener variantes genéticas estables con diferentes fenotipos a los de la cepa madre pudiéndose, de este modo, obtener cepas con mejores propiedades tecnológicas.



**objetivos**

---



Debido a que los fagos de bacterias lácticas integrantes de cultivos starters representan una de las causas principales de problemas de acidificación en la industria láctea mundial, ocasionando serias dificultades tecnológicas y económicas, para el presente trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

#### Objetivo General

---

- Profundizar en el conocimiento de la interacción entre bacterias lácticas (BAL) presentes en fermentos para la industria láctea y sus fagos específicos.

#### Objetivos Particulares

---

- Actualización bibliográfica.
- Selección y puesta a punto de métodos analíticos para el trabajo con bacteriófagos.
- Estudiar la difusión de fagorresistencia en cepas salvajes de *Streptococcus thermophilus* y lactococos, y los mecanismos de resistencia asociados.
- Determinar si la lisogenia es realmente un fenómeno difundido en la especie *Lactobacillus delbrueckii*.
- Investigar la relación existente entre la fagorresistencia y la heterogeneidad celular en la cepa *Lb. delbrueckii*. subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>.
- Obtener cepas de BAL con una resistencia fágica aumentada.



**materiales y métodos**

---



## 3.1. CEPAS

---

### 3.1.1. Cepas usadas

#### 3.1.1.1. *Streptococcus thermophilus*

Se utilizaron 14 cepas salvajes de *S. thermophilus*, pertenecientes a la colección del INLAIN y aisladas de fermentos artesanales de leche utilizados en queserías de la región. Las mismas fueron identificadas como *St.C*, *St.4*, *St.149*, *St.115*, *St.17*, *St.66*, *St.2*, *St.43*, *St.42*, *St.24*, *St.94*, *St.119*, *St.132* y *St.59*. Para su utilización en los experimentos las cepas se cultivaron previamente en caldo Elliker (BIOKAR Beauvais, France) (Anexo) y se incubaron a 37°C.

#### 3.1.1.2. *Lactococcus lactis*

Se emplearon 6 cepas salvajes de *L. lactis* subsp. *lactis*, aisladas de leche y quesos artesanales de la provincia de Corrientes y cedidas para este estudio por la Dra. Olga Vasek. Las cepas, denominadas *L.138*, *L.140*, *L.199*, *L.35*, *L.166* y *L.207*, se cultivaron en caldo Elliker, a 30 °C.

#### 3.1.1.3. *Lactobacillus helveticus*

Se utilizaron las cepas *Lb. helveticus* CNRZ 241 (portadora del profago 0241) y *Lb. helveticus* CNRZ 892 (sensible al fago temperado 0241), pertenecientes a la colección de la Station de Recherches Latieres dell 'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, Francia). Las cepas fueron desarrolladas a 42°C en caldo MRS (BIOKAR, Beauvais, France) (Anexo).

#### 3.1.1.4. *Lactobacillus delbrueckii*

Se utilizó una cepa de *Lb. delbrueckii* perteneciente a la colección del INLAIN y aislada a partir de un fermento comercial liofilizado. La misma fue identificada como *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>. Para su utilización en los ensayos la cepa se cultivo en caldo MRS a 42°C.



### 3.1.2 Conservación de cepas

Las cepas fueron conservadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , en leche descremada reconstituida (LDR 10% v/v) (Anexo) (MERCK, Darmstadt, Germany) y en caldos ELLIKER (*S. thermophilus* y *L. lactis*) o MRS (*Lb. herveticus* y *Lb. delbrueckii*), estos últimos adicionados de glicerol al 15% (v/v) (Neviani y col. 1992).

#### 3.1.2.1 Congelamiento en leche descremada reconstituida (LDR)

Partiendo de un cultivo coagulado (16-18 hs) de la cepa en LDR, se repartieron alícuotas de 0,2-0,3 ml en crioviales estériles (capacidad: 1,5 ml), completándose con LDR estéril hasta 1 ml. Los mismos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.2.2 Congelamiento en caldo-glicerol

Las cepas fueron desarrolladas overnight en el caldo correspondiente y a temperatura óptima de desarrollo en cada caso. Estos cultivos fueron adicionados al 10% (v/v) a la solución crioprotectora (caldo adicionado de 15% v/v de glicerol), repartidos en alícuotas de 1 ml en crioviales estériles y luego congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 3.2 FAGOS

---

### 3.2.1 Fagos usados

#### 3.2.1.1 Fagos de *Streptococcus thermophilus*

Se utilizaron los fagos autóctonos CYM, T<sub>7</sub> y YCS (cepas sensibles *St. 10*, *St. T<sub>7</sub>* y *St. Cc<sub>1</sub>*, respectivamente). Estos fagos pertenecen a la fagoteca del INLAIN y fueron aislados de procesos defectuosos de yogur de plantas industriales de la región.



### 3.2.1.2 Fagos de *Lactococcus lactis*

Se emplearon cinco fagos autóctonos, identificados como QF12 (cepa sensible, *L. lactis* Mo12), QP4 (cepa sensible, *L. lactis* 15-1), QF9 (cepa sensible, *L. lactis* CL<sub>2</sub>), CHD (cepa sensible, *L. lactis* CL<sub>2</sub>) y 046 (cepa sensible, *L. lactis* 13-3). Los mismos se aislaron de plantas queseras de la región y pertenecen a la fagoteca del INLAIN.

### 3.2.1.3 Fagos de *Lactobacillus helveticus*

Para los ensayos de lisogenia se utilizó el fago temperado 0241 (existente en la cepa lisógena *Lb. helveticus* CNRZ 241) y perteneciente a la colección CNRZ (INRA, Jouy en Josas, Francia).

### 3.2.1.4 Fagos de *Lactobacillus delbrueckii*

Se utilizó el fago lítico autóctono YAB, aislado a partir de un proceso defectuoso de elaboración de yogur en el INLAIN. La cepa sensible de este fago fue la cepa comercial *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> aislada del fermento usado en esa elaboración.

## 3.2.2 Conservación de fagos

Suspensiones de partículas fágicas de alto título ( $> 10^6$  UFP/ml) en caldo MRS o ELLIKER, se conservaron en diferentes condiciones:

- ✓ Refrigeración (4°C).
- ✓ Congelamiento a -20°C: las suspensiones de los fagos se adicionaron de un crioprotector (glicerol estéril, 15% v/v). Ésta mezcla se distribuyó en crioviales estériles (1,5 ml de capacidad), en alícuotas de 0,3 ml, que fueron congeladas y mantenidas en freezer.
- ✓ Congelamiento a -80°C: se procedió de manera idéntica que en el caso anterior.



### 3.3 INTERACCION CEPA-FAGO

---

#### 3.3.1 Propagación de fagos

Los fagos utilizados fueron propagados sobre sus correspondientes cepas sensibles, usando caldo MRS (para el caso de las cepas de *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>) y caldo ELLIKER (para el caso de cepas de *S. thermophilus* y *L. lactis*). Cultivos de las cepas obtenidas por incubación durante 16-18 horas (over night) fueron inoculadas en caldo MRS o ELLIKER adicionado de CaCl<sub>2</sub> 10mM (MRS-Ca y ELLIKER - Ca, respectivamente) y del fago correspondiente, a diferentes dosis infectivas (multiplicity of infection (m.o.i) =concentración de partículas virales/concentración de células bacterianas) de entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup> aproximadamente. Asimismo, se inoculó un tubo solo con las cepas (tubos controles), para observar el normal crecimiento de las mismas. Los tubos fueron agitados suavemente en forma periódica y examinados aproximadamente durante 5 horas. Se eligió el tubo para el cual la lisis se manifestó en forma completa y más tardíamente, hecho que aseguró una máxima propagación de las partículas fágicas. El lisado resultante fue pre-filtrado y luego filtrado (filtros Millipore, 0,45 μ de diámetro), como se indicara anteriormente 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.

#### 3.3.2 Titulación de 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). Para ello, se prepararon diluciones decimales de las suspensiones fágicas a controlar (caldo MRS o ELLIKER). A 100 μl de cada dilución se adicionaron 300 μl de un cultivo de la cepa sensible (DO<sub>560nm</sub> = 0,5), y 3 ml de MRS/ ELLIKER soft-agar (Anexo). Las mezclas se distribuyeron en cajas de Petri conteniendo 10 ml de agar MRS/ELLIKER-Ca (10 mM Ca Cl<sub>2</sub>) (Anexo) ya solidificado. Cuando se usaron cajas de Petri divididas en cuartos, se mezclaron 100 μl de la dilución del fago, 100 μl del cultivo de la cepa sensible y 1 ml de MRS/ELLIKER



(10 mM CaCl<sub>2</sub>) soft-agar (Anexo), en cada una de las divisiones de la caja. La incubación se efectuó a 30 °C o 42 °C, según el caso, en microaerofilia durante una noche y se llevó a cabo el recuento de las placas de lisis para obtener los títulos correspondientes (PFU/ml= Plaque Forming Units/ml) (Svensson y Christiansson, 1991).

### 3.3.3 Ensayo de sensibilidad en medio líquido (Test de Turbidez)

Cultivos overnight de las cepas, se inocularon en caldo MRS-Ca o caldo ELLIKER-Ca. Los tubos fueron infectados con el fago lítico en estudio (m.o.i ≈ de 0,5) Después de una agitación suave, se incubaron junto con un tubo control de la cepa bacteriana sin infectar con el fago. Los tubos fueron periódicamente examinados y agitados durante la incubación, a temperatura óptima en cada caso observándose la existencia de lisis celular. Para establecer la resistencia o sensibilidad de una cepa frente a un fago específico, se hicieron hasta 3 repiques de los cultivos en caldo fresco (Reinheimer y col, 1993). Según los resultados, y por comparación con el control, se estableció la sensibilidad (lisis de los cultivos), o resistencia (ausencia de lisis durante los repiques) de las cepas en estudio. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.3.4 Spot Test

Sobre bases de agar ELLIKER-Ca o agar MRS-Ca, se agregó una mezcla de 0.4 ml de un cultivo obtenido a partir de 16-18 hs de incubación del fermento en caldo y 4 ml de soft agar (0,6% agar) del medio correspondiente. Se secaron estas placas durante 30 minutos (en 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 o 30 °C según el caso, durante 18 hs. Durante la incubación, las cepas presentes en el fermento forman un césped denso, y en el caso que existan bacteriófagos o sustancias inhibidoras en los filtrados, aparece un halo de inhibición (zona clara) en la zona donde se depositó la gota (Svensson y Christiansson, 1991).



### 3.4 CARACTERIZACION DE LA FAGORRESISTENCIA

---

En aquellas cepas que resultaron resistentes a los fagos fue caracterizado el fenotipo de la fagorresistencia:

#### 3.4.1 EOP (Eficiencia de plaqueo)

Una suspensión fágica (título  $10^8$  UFP/ml, aproximadamente) fue titulada paralelamente sobre la cepa sensible y la cepa testeada ( $DO_{560nm} = 0,5$ ), utilizando el método de doble capa agarizada. La relación entre el título fágico logrado con la cepa en estudio y el obtenido con la cepa sensible fue considerado el EOP del fago (EOP= UFP/ml sobre cepa test/UFP/ml sobre cepa sensible). Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 3.4.2 Estabilidad de la fagorresistencia

Se determinó estableciendo un número máximo de 7 subcultivos de las cepas en caldo MRS o ELLIKER adicionados de  $CaCl_2$  10mM , agregando en cada repique una nueva dosis de fago para asegurar una fuerte presión fágica. La lisis del cultivo en alguno de los repiques indicó la pérdida de la fagorresistencia (Carminati y col., 1993).

#### 3.4.3 Estudio de los mecanismos de fagorresistencia

##### 3.4.3.1 Adsorción

Una alícuota de 5 ml de un cultivo de la cepa en estudio, en fase exponencial de desarrollo ( $DO_{560nm} \approx 0,5$ ), se centrifugó (3000 rpm-5 min.), resuspendiéndose el pellet en caldo MRS-Ca o ELLIKER-Ca (en la mitad del volumen inicial). Estos cultivos fueron infectados con el fago específico (m.o.i  $\approx 0,02$ ) en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad incubándose a temperatura óptima en cada caso, en baño de agua termostaticado. Luego de 30 minutos los tubos fueron retirados y centrifugados (12000 rpm-10 min.) para eliminar las células con los fagos adsorbidos. Las partículas fágicas no adsorbidas que quedaron en el sobrenadante se



titularon sobre la cepa sensible. Los resultados se expresaron en porcentaje de partículas adsorbidas en relación al número inicial de fagos puestos en contacto con las células bacterianas (Neviani y col., 1992).

#### 3.4.3.2 Restricción/Modificación (R/M)

Para las cepas autóctonas que ofrecieron una adsorción alta pero una lisis tardía en medio líquido se investigó la presencia de mecanismos de fagorresistencia intracelular, tales como R/M. Un filtrado con elevada concentración de fagos se tituló sobre la cepa sensible y sobre la cepa resistente, utilizando el método de la doble capa agarizada. Se levantaron 1-2 placas de lisis de la caja de Petri correspondiente a la cepa resistente (producidas por el fago modificado) y se colocaron en 5 ml de caldo adicionado de  $\text{CaCl}_2$ , dejándolas un día en heladera para que el fago difundiera al medio. Luego se sembró en el tubo la cepa resistente, para elevar el título del fago modificado. Se incubó hasta lisis del cultivo, siempre comparando con un control sin fago, y el lisado se filtró con filtro Millipore 0,45 $\mu\text{m}$ . Este filtrado se tituló sobre ambas cepas para comparar ambos recuentos y concluir si existe o no un mecanismo de resistencia del tipo R/M (igual título para ambas cepas). Para probar la reversibilidad de la modificación, se procedió a levantar una placa de lisis de la caja de Petri del recuento sobre la cepa resistente (fago modificado) y se volvió a propagar sobre la cepa sensible. De esta manera, en ausencia del sistema R/M, el fago se desmodifica (pierde la metilación). Este filtrado, al ser titulado sobre ambas cepas, debería presentar una disminución del EOP (hasta el valor original), confirmándose así la presencia de R/M en la cepa resistente (de los Reyes Gavilán y col., 1990).

### 3.5 LISOGENIA EN *Lactobacillus helveticus* CNRZ 0241

---

#### 3.5.1 Cepas y fagos usados

Se usaron las siguientes cepas: *Lb. helveticus* CNRZ 241 (cepa lisógena); *Lb. helveticus* CNRZ 892 (cepa hospedadora) y el fago temperado CNRZ 0241, originarios de la



*Station de Recherches Laitieres dell'INRA* (INSTITUT NATIONAL RECHERCHE AGRONOMIQUE, JOUY-EN JOSAS, Francia).

### 3.5.2 Medios de cultivo

Las bacterias fueron desarrolladas en medio MRS líquido (BIOKAR, Beauvais, France), en algunos casos suplementado con  $\text{CaCl}_2$  10mM. El medio agarizado utilizado fue MRS (BIOKAR, Beauvais, France) conteniendo 1,2% (p/v) de agar.

### 3.5.3 Liberación espontánea del profago CNRZ 0241

#### 3.5.3.1 Influencia de la temperatura

Con el objeto de estudiar el efecto de la temperatura de desarrollo de la cepa lisógena *Lb. helveticus* 241 en la liberación de su profago 0241, se realizaron cinéticas de liberación fágica a distintas temperaturas. Las temperaturas seleccionadas fueron 30°C, 37°C y 42°C (rango de temperaturas a la cual la cepa puede crecer). Para tal fin se inocularon tubos de Caldo MRS (5ml) con un cultivo over-night de la cepa lisógena (1%) y se pusieron a incubar a las temperaturas seleccionadas. Se realizaron recuentos de partículas fágicas al inicio y a intervalos de tiempo previamente determinados. El tiempo total de la experiencia fue de 24 h.

Paralelamente, se realizó el seguimiento del desarrollo celular con mediciones de absorbancia (560 nm) y recuentos celulares. Los recuentos se realizaron en Agar MRS (microaerofilia), incubando las placas 48 h a 42 °C.

Se graficaron las evoluciones de los recuentos de partículas fágicas (UPF/ml) vs. tiempo, recuento celular (UPF/l) vs. tiempo y absorbancia (560 nm) vs. tiempo.

#### 3.5.3.2 Influencia del pH en la viabilidad de los fagos

Se estudió la influencia que la disminución del pH causado por el desarrollo celular ejerció en la viabilidad del fago liberado 0241. Para tal fin se prepararon fracciones de Caldo MRS, las cuales fueron llevados a pH con ácido láctico al 50% y posteriormente esterilizadas



por filtración (Millipore, 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro). Los pH seleccionados fueron 3,8 y 4,5. La selección de los pHs se basó en los valores observados a las 7 h. de desarrollo y a las 24 h. A intervalos de tiempo determinados se realizó el recuento de partículas fágicas.

#### 3.5.4 Influencia de la concentración de Mitomicina C en la liberación del profago CNRZ 0241

Se siguió la metodología de Reyrolle y col. (1982), para lo cual se sembraron tubos con 10 ml de medio con un cultivo overnight de la cepa lisógena. Se incubaron a temperatura óptima de desarrollo (42°C) hasta una  $\text{DO}_{560\text{nm}} = 0,15$ , agregando luego el agente inductor en diferentes concentraciones (0,1-0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ ).

Continuando con la incubación, se realizaron mediciones de D.O. en todos los tubos (con Mitomicina C (Anexo) y sin Mitomicina-tubo testigo) y se centrifugaron (3000 rpm-5 min.) alícuotas en tubos Eppendorf. Se separaron los sobrenadantes y se titularon utilizando la cepa sensible al profago liberado según la técnica de doble capa agarizada (Reyrolle y col, 1982). Para la inducción propiamente dicha se adicionó Mitomicina C (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) en cultivos (10 ml) de las cepas en estudio a una D.O: 0,15-0,20 ( $\text{DO}_{560\text{nm}}$ ). Se incubaron los tubos durante 20 hs y luego de centrifugaron (3000 rpm-5 min) alícuotas y el sobrenadante se filtró con filtros Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ). Los filtrados se mantuvieron a 5°C en heladera.

### 3.6 DIFUSION DE LA LISOGENIA EN *Lactobacillus delbrueckii*

---

#### 3.6.1 Inducción con Mitomicina C y detección de cepas sensibles

Las cepas que se utilizaron para la inducción se detallan en la Tabla 7. Cultivos en fase exponencial de las cepas ( $\text{D.O}_{560\text{nm}} \approx 0,15$ ) se adicionaron de Mitomicina C (MC) en una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Los tubos se incubaron a 42 °C hasta observar buen desarrollo en el tubo control (cultivo sin adición de MC), evaluado por medición de la absorbancia a 560 nm.



Se centrifugaron los cultivos (12000 rpm-10 min- temperatura ambiente), se filtraron (Millipore, 0,45  $\mu\text{m}$ ) y se evaluó la posible presencia de fagos en los sobrenadantes testeándolos frente a una serie de cepas presuntamente hospedadoras (*L./192*; *L./193*; *L./195*; *L./197*; *L./200*; *L./203*; *L./204*; *L./205*; *L./209*; *L./212*; *L./216*; *L./217*; *L./218*; *L./219*; *L./242*; *L./254*; *L./Cb1*; *L./Gb2*; *L./M*; *L./CNRZ 326*; *L.b 342*; *L.b c. 332*; *L.b Hb2*; *L.b Eb4* y *L.b Bb1*).

Las metodologías utilizadas para tal fin fueron el Spot-Test y el Test de Turbidez (Svensson y Christiansson, 1991). Ambas metodologías se utilizaron con los sobrenadantes tal cual y calentados 15 min. a 90 °C. Este tratamiento térmico garantiza la muerte de las partículas fágicas que pudieran estar presentes y permite visualizar si el efecto inhibitor es debido a un compuesto de otra naturaleza, resistente al tratamiento térmico aplicado. En el Spot-Test se utilizó como control medio de cultivo fresco (MRS) adicionado de MC en igual concentración que la usada en la inducción, para descartar zonas de inhibición ocasionadas por dichos compuestos.

### 3.6.2 Aislamiento y purificación de fagos temperados liberados

Los profagos activos, es decir aquellos que fueron infectivos sobre alguna cepa hospedadora, se purificaron y propagaron sobre las mismas. La purificación se realizó titulando el fago mediante el método de doble capa agarizada, levantando una placa de lisis en un tubo con medio líquido (Caldo MRS adicionado de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  10 mM) y propagando las partículas virales adicionando la cepa hospedadora a dicho tubo, incubando a 42 °C hasta lisis del cultivo, comparado con un control únicamente con la cepa. Este procedimiento se realizó por triplicado. Una vez purificados, los fagos temperados en alto título se conservaron por congelamiento a -20°C y -80°C, en caldo MRS adicionado de glicerol (15% v/v) como crioprotector.



Tabla 7. Identificación y origen de cepas (Suárez y col. 2008).

Cepas	Genero/especie/subespecie	Origen( cultivo/país)
<i>L. / 192</i> <sup>†</sup>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 193</i> <sup>†</sup>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 195</i> <sup>†</sup>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 197</i> <sup>†</sup>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 200</i> <sup>†</sup>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 203</i> <sup>†</sup>		Provolone suero starter ( Italia)
<i>L. / 204</i> <sup>†</sup>		Provolone suero starter ( Italia)
<i>L. / 205</i>		Provolone suero starter ( Italia)
<i>L. / 209</i>		Provolone suero starter ( Italia)
<i>L. / 212</i>		Provolone suero starter ( Italia)
<i>L. / 216</i>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 217</i> <sup>†</sup>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 218</i>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 219</i>		Grana Padano suero starter( Italia)
<i>L. / 242</i>		Grana Padano suero starter ( Italia)
<i>L. / 254</i> <sup>†</sup>		Provolone suero starter ( Italia)
<i>L. / Cb1</i> <sup>†</sup>		Starter de yogur comercial (Argentina)
<i>L. / Gb2</i> <sup>†</sup>		Starter de yogur comercial (Argentina)
<i>L. / M</i> <sup>†</sup>		Queso cremoso ( Argentina)
<i>L. / CNRZ 326</i>		Cepa de colección
<i>L. b 342</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	Yogur (Italia)
<i>L. b c. 332</i> <sup>†</sup>		Starter de yogur comercial (Argentina)
<i>L. b Hb2</i> <sup>†</sup>		Starter de yogur comercial (Argentina)
<i>L. b Eb4</i> <sup>†</sup>		Starter de yogur comercial (Argentina)
<i>L. b Bb1</i> <sup>†</sup>		Starter de yogur comercial (Argentina)

<sup>†</sup> cepas inducidas

\*todas las cepas fueron usadas como presuntivas hospedadoras (excepto *L. / CNRZ 326*) y para realizar la sensibilidad cruzada de los fagos inducidos.



### 3.6.3 Micrografía electrónica de los fagos temperados aislados

Micrografías de fagos temperados activos fueron obtenidas trabajando de acuerdo a Bolondi y col. (1995). Las suspensiones fágicas fueron concentradas mediante centrifugación (1 hora, 70,000 g, 5 °C ) y luego fijadas usando acetato de uranilo (2 % w/v, pH 4,5) o ácido fosfotungstícico (2 % w/v). Las micrografías electrónicas fueron tomadas con microscopio electrónico JEOL 100-C (Jeol USA, Inc. Peabody, MA, USA) trabajando a 80 kV. Se registraron las dimensiones (diámetro de cápsides, ancho y largo de colas) y morfologías fágicas.

## 3.7 HETEROGENEIDAD CELULAR Y FAGORRESISTENCIA EN

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>

---

### 3.7.1 Obtención de variantes morfológicas

Se investigó la aparición de colonias de diferentes morfologías a partir de siembras en superficie de cultivos overnight, usando Agar MRS, Agar 1006, Agar LAPT10<sub>6</sub>, Agar leche y Agar Triptona Soja (Anexo). Las placas fueron incubadas 48 h. a 42°C. Las variantes morfológicas fueron repicadas en Caldo MRS y mantenidas a -80°C. Se realizó un recuento diferencial de las variantes morfológicas obtenidas y se calculó un % de ocurrencia de cada una de ellas.

### 3.7.2 Morfología celular

La morfología celular de la cepa madre (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>) y sus variantes morfológicas espontáneas, fue determinada a través de una observación microscópica directa (a partir de preparados en gota fresca, con inmersión y en contraste de fases), con aumento de 1000 x (Microscopio Trinocular Jenamed 2-Carl Zeiss-Jena). Las diferencias fueron registradas.



### 3.7.3 Obtención de mutantes espontáneos fagorresistentes

La cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> fue infectada en medio líquido (MRS suplementado con CaCl<sub>2</sub> 10mM) con su fago lítico YAB, usando un m.o.i ≈1. Los tubos fueron incubados a 42°C hasta observar lisis comparándolos con un control (cepa sin agregado de fago). Dado que la lisis de la cepa no resultó completa, aún cuando se prolongó la incubación, las células remanentes se sembraron y contaron en agar MRS. Se calculó el porcentaje de cada variante morfológica en estos presuntivos mutantes espontáneos fagorresistentes, comparando con un recuento inicial de la cepa como control.

A partir de estos recuentos, se recuperaron clones de cada variante morfológica, que fueron testeados enfrentándolos con el fago YAB para confirmar la fagorresistencia. Este ensayo fue detallado en el punto 3.4.3. Se calculó un porcentaje de variantes realmente fagorresistentes en relación a variantes morfológicas en la cepa madre.

### 3.7.4 Caracterización de la fagorresistencia

La caracterización de este fenotipo para las variantes morfológicas espontáneas, resistentes al fago YAB se realizó de acuerdo a lo indicado en el punto 3.4.-

### 3.7.5 Caracterización bioquímica de las variantes morfológicas fagorresistentes (Perfil fermentativo de azúcares)

Esta prueba se llevó a cabo utilizando el sistema de identificación API 50 CH (Bio Merieux, l`Etolie, France). Un cultivo de 16-18 horas de cada uno de los clones fagorresistentes, y de la cepa madre, fueron sometidos a centrifugación (6000 rpm-15 min.). El sedimento se resuspendió en 4 ml de agua estéril y nuevamente se centrifugó (6000 rpm-15 min.). Después de un segundo lavado para eliminar el residuo de medio de cultivo, las células fueron resuspendidas en 0,5 ml de agua estéril. Esta suspensión fue inoculada en 10 ml de caldo MRS e incubada hasta obtener una D.O<sub>560nm</sub> ≈ 1,5 - 2,0. Después de haber agregado 0,3



ml de una solución de púrpura de bromocresol (2 mg/ml), el cultivo así preparado, fue distribuido en los 50 compartimentos de la galería API, adicionando luego, algunas gotas de parafina líquida para lograr la anaerobiosis. Todas las galerías se incubaron a 42 °C y la lectura de los resultados se efectuó después de 24 - 48 horas de incubación de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 3.7.6 Caracterización tecnológica de las variantes morfológicas fagorresistentes

#### 3.7.6.1 Actividad acidificante

Se consideró como tal, la acidez desarrollada por una cepa a partir de un cultivo activo (proveniente de tres repiques sucesivos en LDR estéril), inoculado al 1% (v/v) en LDR estéril, con incubación durante 24 horas a 42°C. Luego de ésta incubación se midió el pH, y posteriormente, por titulación, se determinó la acidez desarrollada, en 10 ml de cultivo, con una solución de NaOH N/9 (Dornic) (Anexo) hasta pH 8,4. Los resultados se expresaron en porcentaje de ácido láctico producido. El valor de acidez se calculó de la siguiente manera:

$$^{\circ}\text{D} = \frac{V_{\text{OHNa N/9}} (\text{ml}) \times f_{\text{OHNa}}}{100 \text{ ml muestra}}$$

Debido a que:

$$\begin{aligned} 90\text{g/eq ácido láctico} &\equiv 1 \text{ eq NaOH N/9} \\ 1^{\circ}\text{D} &\equiv 0.01\% \text{ ácido láctico} \end{aligned}$$

#### 3.7.6.2 Actividad proteolítica

Se utilizó el método de OPA (Church y col.1983), empleando o-ftaldehído (Anexo) como reactivo, el cual en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, posee la capacidad de unirse a los grupos  $\alpha$ -amino liberados por acción del sistema proteolítico bacteriano, generando así un producto que absorbe fuertemente a  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .



De un cultivo (24 h, 42°C) en LDR de cada cepa sensible y sus mutantes fagorresistentes, se tomaron 5 ml (provenientes de tres repiques sucesivos en LDR), a los cuales se les adicionó 1 ml de agua bidestilada y 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,75 N (Anexo). Los tubos se agitaron vigorosamente con vortex y durante 10 min se dejaron en reposo, para favorecer la precipitación de proteínas y péptidos de mayor tamaño. Posteriormente se centrifugaron (10000 rpm-5 min), recuperando los sobrenadantes (donde se localizan los péptidos cortos y aminoácidos liberados). A una alícuota (50 µl) de estos sobrenadantes se les adicionó 1 ml de reactivo de OPA (Anexo), preparado en el momento los cuales se dejaron reaccionar durante 2 min. Concluido dicho tiempo, para cada muestra, se determinó la absorbancia ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ). También se procesó un control de LDR sin inocular (testigo) de la misma forma que los cultivos bacterianos. Los resultados se expresaron según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad proteolítica} = (A_{340\text{nm}}) \text{ muestra} - (A_{340\text{nm}}) \text{ testigo}$$

### 3.7.7 Caracterización genética de las variantes morfológicas fagorresistentes

Los estudios genéticos fueron realizados en el Istituto Sperimentale Lattiero Caseario (ILC, Lodi, Italia), con la colaboración de los Dres. Giorgio Giraffa y Domenico Carminati, y la Dra. Daniela M. Guglielmotti.

#### 3.7.7.1 Extracción del ADN total

El protocolo que se utilizó (descrito por MicroSeq<sup>TM</sup>) se basa en una extracción rápida (en comparación con la extracción tradicional del ADN total bacteriano), donde se utilizan resinas quelantes según el método descrito para bacterias Gram + (y acidificantes), y utilizando los reactivos incluidos en el kit (Giraffa y col. ,2000).



Alícuotas de 200 µl de cultivos overnight (16-18 h, 42°C) de las cepas sensibles y sus mutantes fagorresistentes, fueron centrifugadas (7500 rpm- 4°C-5 min,) en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. A los pellets obtenidos se los lavó con 500 µl de buffer TE<sub>0,1</sub> (Anexo) y centrifugaron nuevamente (7500 rpm- 4°C-5 min,). Se descartó el sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos en 245 µl de buffer TE<sub>0,1</sub>, adicionándose 5 µl de lisozima (50 mg/ml) (Anexo). Se incubó dicha mezcla durante 45 min a 56°C en baño termostatzado. Luego de la incubación, se adicionó 250 µl de “mezcla de lisis” (buffer TE<sub>0,1</sub>, DTT 1 M, EDTA 0,25 M, SDS 10% (p/v) y proteinasa K 20 mg/ml), en cada tubo, incubándose en baño termostatzado durante 1 h a 37°C. Luego, se adicionaron 500 µl de solución de Chelex (5% p/v) (Anexo) a cada una de las muestras, reincubándose a 56°C durante 15-30 min en baño termostatzado. La función de la solución de Chelex, es la de retener las impurezas del ADN extraído. Los tubos se agitaron en vortex durante 10 seg, y luego se incubaron 8 min a 100°C. Se centrifugaron los tubos (10000 rpm-2 min), y los sobrenadantes fueron transferidos, cuidadosamente a tubos Eppendorf limpios. A partir de éstos, se realizaron diluciones 1:10 en agua estéril, las cuales fueron congeladas (tanto las muestras diluidas como las no diluidas) a -20°C hasta el momento de su utilización.

### 3.7.7.2 Amplificación del gen 16S del rRNA y restricción con *EcoRI* (PCR-ARDRA) PCR-amplified ribosomal DNA restriction analysis

Con el objetivo de confirmar la identificación de especie/subespecie de las cepas, fue aplicado el análisis PCR-ARDRA, incluyéndose dos cepas “type” como controles positivos: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315<sup>T</sup> y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842<sup>T</sup>.

La amplificación de los genes de la región 16S del rRNA fue realizada en un volumen total de 25 µl, conteniendo 2,5 µl de buffer de PCR 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de los oligonucleótidos iniciadores, 1 µl de ADN genómico y 2,5 U/100 µl de DNA *Taq* polimerasa. El termociclador usado fue un Perkin Elmer modelo 9700. El programa PCR usado fue:



- ✓ 2 min - 94°C ( desnaturalización inicial )
  - ✓ 30seg- 94°C ( desnaturalización de los productos de amplificación),
  - ✓ 30seg- 60°C ( hibridación de primers),
  - ✓ 30seg- 72°C ( elongación),
  - ✓ 7-10 min-72°C ( elongación final)
- } 30 CICLOS

Esto permite obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 1,5 kbp, correspondientes a los genes que codifican para la región 16S del ARNr, usando los oligonucleótidos iniciadores descritos por Rodtong y Tannock (1993):

- ✓ 5'-CCGAGCTCAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- ✓ 'GGTCGACCGTTAATACGACTCACTATAGGGATACCTTGTTACGACTT-3'.

Luego de esto, se procedió a cortar el fragmento amplificado, utilizando la enzima de restricción *EcoRI*. Con este fin, se pusieron en contacto 10 µl del ADN amplificado con *EcoRI* y el buffer correspondiente, siendo el volumen total de 15 µl. La mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C en baño termostatzado. Una vez finalizada la incubación, se sembraron los 15 µl del producto de la digestión enzimática en geles de agarosa (1.5 %v/v), adicionado de buffer de carga (loading buffer,). Los pocillos de los extremos del gel se sembraron con 15 µl de marcador de peso molecular 1 Kbp (Plus DNA Ladder, InvitroGen, Italy). Luego, se realizó la corrida electroforética a 26 V durante toda una noche. Las bandas obtenidas fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio y luz UV. Las imágenes de los perfiles de restricción fueron capturadas mediante sistema digital (EDAS 290: Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290) provisto de un gabinete de captura de imágenes EDAS 290, y guardadas como archivos de imágenes JPEG.

### 3.7.7.3 RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR)

Mediante el análisis de los perfiles RAPD, se determinó la homología genética o grado de similitud entre la cepa madre, sensible al fago, y los derivados morfológicos y fagorresistentes. Para esto, se partió de ADN total bacteriano extraído de la cepa sensible y de sus mutantes fagorresistentes (como se detalló anteriormente). Se usaron dos oligonucleótidos iniciadores, o primers, en ensayos independientes. Estos primers fueron M13



(Huye y Hall, 1989) y 1254 (Akopyanz y col, 1992), cuyas secuencias son 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' y 5'-CCGCAGCCAA-3', respectivamente. El ensayo de PCR se realizó en un volumen total de 25  $\mu$ l, conteniendo 2,5  $\mu$ l de buffer de PCR 10X, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 U/100  $\mu$ l de DNA *Taq* polimerasa, 3,0 mM de  $MgCl_2$ , 2,0  $\mu$ M de primer M13 ó 0,8  $\mu$ M de primer 1254, y 1,5  $\mu$ l de ADN bacteriano. El programa de amplificación para el primer M13 se llevó a cabo de acuerdo a Giraffa y col. (2000). Las etapas realizadas fueron las siguientes:

- ✓ 2 min- 94°C (desnaturalización inicial)
  - ✓ 1 min-94 °C (desnaturalización)
  - ✓ 20 seg- 45 °C (hibridación primers)
  - ✓ 2 min- 72 °C (elongación)
  - ✓ 10 min- 72 °C (elongación final)
- } 40 CICLOS

Para llevar a cabo la amplificación utilizando el primer 1254, se necesitaron:

- ✓ 5 min-94°C
  - ✓ 5 min- 36°C
  - ✓ 5 min- 72°C
- } 4 ciclos iniciales
- ✓ 1 min-94°C (desnaturalización)
  - ✓ 1 min- 36 °C (hibridación)
  - ✓ 2 min- 72 °C (elongación)
  - ✓ 10 min-72°C (elongación)
- } 30 ciclos

Luego de la amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (1,5% p/v). Las bandas obtenidas fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio y aplicación de luz UV. Se utilizó 1kbp Plus DNA Ladder, (InvitroGen, Italy) como marcador de peso molecular de ADN. Las imágenes de los perfiles de amplificación fueron capturadas mediante un sistema digital provisto con el gabinete de captura de imágenes, y guardadas como archivos TIFF. Posteriormente fueron analizadas utilizando el software para análisis de perfiles de BioNumerics™ (Versión 3.0; Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Basándose en el coeficiente de *r* de Pearson se realizó el cálculo de similitudes de los perfiles, y las cepas fueron agrupadas usando UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Averages) (Vauterin y Vauterin, 1992).



**resultados**

---



## 4.1. FAGORRESISTENCIA EN *Streptococcus thermophilus*

---

### 4.1.1. Difusión de la fagorresistencia en cepas salvajes de *S. thermophilus*

De las 14 cepas salvajes de *S. thermophilus* testeadas frente a los 3 fagos autóctonos específicos (CYM, T<sub>7</sub> y YCS), solamente la cepa *St.* 4 frente al fago CYM se manifestó sensible (lisis en medio líquido). El resto de las cepas estudiadas resultaron resistentes frente a los 3 fagos ensayados, ya que no se observó lisis hasta el tercer repique (Tabla 8.).

### 4.1.2. Caracterización de la fagorresistencia en cepas de *S. thermophilus*

#### 4.1.2.1. EOP (Eficiencia de plaqueo)

No se reveló la formación de placas de lisis en este ensayo cuando se utilizaron suspensiones fágicas de alto título sobre las cepas estudiadas, determinándose un alto nivel de resistencia de todas las cepas frente a los 3 fagos específicos utilizados. En todos los casos el valor del EOP fue  $> 10^{-8}$  UFP/ml.

#### 4.1.2.2. Estabilidad de la fagorresistencia

Las 14 cepas estudiadas demostraron una elevada estabilidad en su resistencia frente a los 3 fagos autóctonos utilizados ya que 11 de ellas (80% del total de cepas) resultaron resistentes hasta el 7<sup>mo</sup> repique en este ensayo con los 3 fagos estudiados (Tabla 8.).

Las cepas *St.* 66 y *St.* 149 resultaron muy estables (resistentes) a dos de los fagos (YCS y T<sub>7</sub>) al cabo de los 7 repiques realizados, pero poco estables en presencia del tercero (CYM), ya que frente a una alta presión de éste, lisaron en el segundo repique.

Por último, para la cepa *St.* 4, más allá de su clara sensibilidad al fago CYM, su resistencia frente al fago T<sub>7</sub> resultó débil (lisis en el segundo repique) pero muy estable para el fago YCS, al cabo de los 7 repiques realizados.



Tabla 8. Fagorresistencia y estabilidad del fenotipo, para cepas salvajes de *S. thermophilus* frente a fagos líticos autóctonos.

Cepas	FAGO		
	CYM	T <sub>7</sub>	YCS
<i>St.C</i>	-	-	-
<i>St.2</i>	-	-	-
<i>St.4</i>	+	-(2°)	-
<i>St.17</i>	-	-	-
<i>St.24</i>	-	-	-
<i>St.42</i>	-	-	-
<i>St.43</i>	-	-	-
<i>St.59</i>	-	-	-
<i>St.66</i>	-	-	-(2°)
<i>St.94</i>	-	-	-
<i>St.115</i>	-	-	-
<i>St.119</i>	-	-	-
<i>St.132</i>	-	-	-
<i>St.149</i>	-	-(3°)	-

Referencias:-: resistencia fágica (ausencia de lisis) muy estable (hasta el 7° repique); +: sensible (lisis en el 1° repique); (n°): número de repique en el que se verificó la lisis en el ensayo de estabilidad. Los ensayos fueron realizados por triplicado

#### 4.1.3. Estudio de los mecanismos de fagorresistencia

##### 4.1.3.1. Interferencia en la adsorción

La Fig. 10. muestra las tasas de adsorción (30 min-37°C) obtenidas para los 3 fagos sobre las diferentes cepas autóctonas de *S. thermophilus* ensayadas. De los 42 valores obtenidos, 30 de ellos (71%) resultaron < 25%, indicando un bloqueo total o casi total de la adsorción (Fig. 11.). Todos estos casos se correspondieron con altos niveles de estabilidad en la resistencia fágica, mostrados en la Tabla 8.

En 8 de los ensayos realizados, los valores de adsorción se ubicaron entre el 40% y el 73% y se correspondieron con una alta (5 casos) y baja (3 casos) estabilidad fágica. Estos 3 últimos casos corresponden a los sistemas cepa/fago para los que se detectó lisis en el 2° o 3° repique (sistemas *St. 4/T<sub>7</sub>*, *St. 66/YCS* y *St. 149/T<sub>7</sub>*) en el ensayo de estabilidad con las tasas de adsorción de alrededor del 70%.

Por último, para 4 casos (*St. 4/CYM*, *St. 59/CYM*, *St. 94/ T<sub>7</sub>* y *St. 94/YCS*), las tasas de adsorción fueron altas (alrededor del 80%). Sin embargo una clara sensibilidad fágica fue sólo observada para el primero de estos tres sistemas. En los tres restantes, las cepas fueron



claramente resistentes y esta resistencia, a su vez, muy estable (Tabla 8.). En estos últimos casos evidentemente existen uno o más mecanismos intracelulares de fagorresistencia.

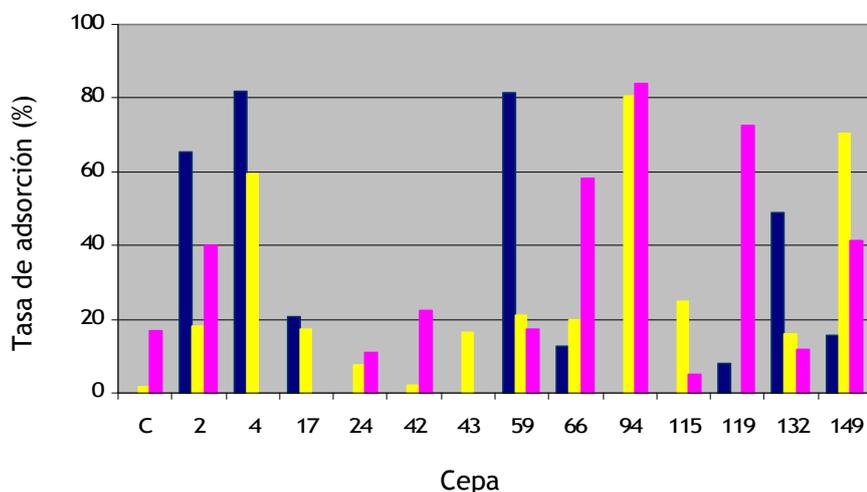


Fig. 10. Adsorción (%; 30 min-37°C) de fagos líticos autóctonos (CYM ■, T<sub>7</sub> ■ y YCS ■) sobre cepas salvajes de *S. thermophilus* (valores promedio de tres determinaciones).

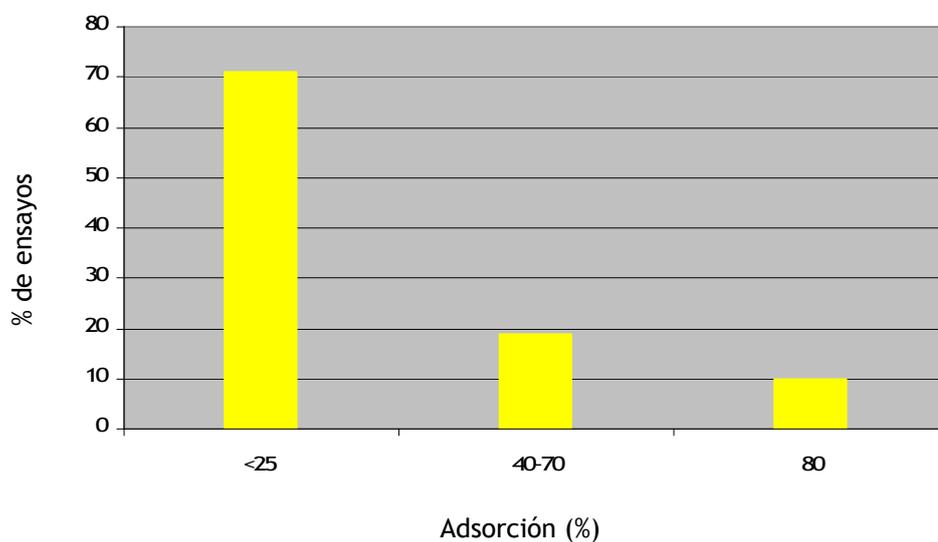


Fig. 11. Distribución porcentual de la tasa de adsorción fágica (%) para las cepas de *S. thermophilus* frente a los 3 fagos específicos usados.



## 4.2. FAGORRESISTENCIA EN *Lactococcus lactis*

---

### 4.2.1. Difusión de la fagorresistencia en cepas salvajes de *L. lactis*

Las 6 cepas de *L. lactis* salvajes testeadas frente a los 5 fagos autóctonos empleados (QF12, QP4, QF9, CHD y 046), resultaron resistentes en el ensayo de sensibilidad en medio líquido (ausencia de lisis del cultivo hasta el 3<sup>er</sup> repique consecutivo).

### 4.2.2. Caracterización de la fagorresistencia en cepas de *L. lactis*

#### 4.2.2.1. EOP (Eficiencia de plaqueo)

No se reveló la formación de placas de lisis en este ensayo cuando se utilizaron suspensiones fágicas de alto título sobre las cepas estudiadas, determinándose un alto nivel de resistencia de todas las cepas frente a los 5 fagos específicos utilizados. En todos los casos el valor del EOP fue  $> 10^{-8}$  UFP/ml.

#### 4.2.2.2. Estabilidad de la fagorresistencia

Todas las cepas mantuvieron la resistencia hasta el séptimo repique, a excepción de la cepa 166 que frente al fago QF12 mostró lisis en el 3<sup>o</sup> repique.

### 4.2.3. Estudio de los mecanismos de fagorresistencia

#### 4.2.3.1. Interferencia en la adsorción

El ensayo de adsorción se realizó utilizando el fago QF12. Los valores de adsorción de este fago sobre todas las cepas de *L. lactis* resultaron superiores al 87%. Estos altos valores de adsorción y la elevada resistencia fágica indican que las cepas de *L. lactis* poseen mecanismos intracelulares de resistencia fágica, altamente efectivos.



#### 4.3. LI SOGENIA EN *Lactobacillus helveticus* CNRZ 241

---

##### 4.3.1. Liberación espontánea del profago CNRZ 0241

###### 4.3.1.1. Influencia de la temperatura

La Fig. 12. muestra las cinéticas de crecimiento de la cepa a 30°C, 37°C y 42°C. Se observa que la temperatura óptima de crecimiento es de 42°C y que a 30°C la cepa prácticamente no crece. Las variaciones de pH de estos cultivos se muestran en la Fig.13.

El efecto de la temperatura sobre la liberación espontánea de fagos se muestra en la Fig. 14, A 30 °C la concentración inicial ( $4 \cdot 10^2$  UFP/ml) de fagos libres del cultivo prácticamente no se modifica, sufriendo un incremento de aproximadamente un orden logarítmico a las 7 horas. A 37°C y 42 °C las cinéticas de liberación de fagos resultaron similares con valores máximos de  $3 \cdot 10^4$  UFP/ml alcanzados a las 6-7 horas de incubación, luego de lo cual, los títulos fágicos descendieron hasta alcanzar los valores de  $t=0$  a las 16 horas, aproximadamente.

###### 4.3.1.2 Influencia del pH en la viabilidad del profago liberado

El descenso en los recuentos de fagos liberados luego de alcanzar el máximo valor indicado podría deberse a 2 causas: re-lizogenización de los fagos o inactivación por la acidez del medio. Para verificar esto último se estudió la viabilidad de los profagos liberados a las 2,5 horas de incubación (separados por filtración) en caldo MRS ajustado a pH 3,8 y 4,5.

Se partió de un título inicial de  $2,2 \cdot 10^5$  UFP/ml, y al enfrentarlo inicialmente con un pH de 3,8 no se detectaron ( $< 10$  UFP/ml) fagos activos luego de una hora (Tabla 9.). A este tiempo y a pH 4,5, en cambio, el recuento de fagos fue de  $4,5 \cdot 10^2$  UFP/ ml, pero al cabo de 3 horas, no fue detectable.

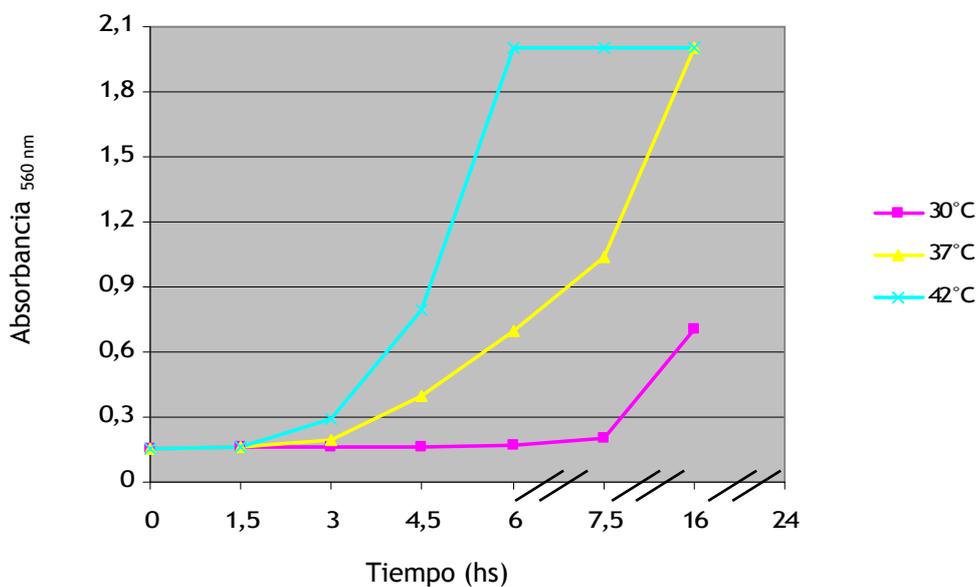


Fig. 12 Cinéticas de crecimiento de la cepa lisógena *Lb. helveticus* CNRZ 241, a distintas temperaturas

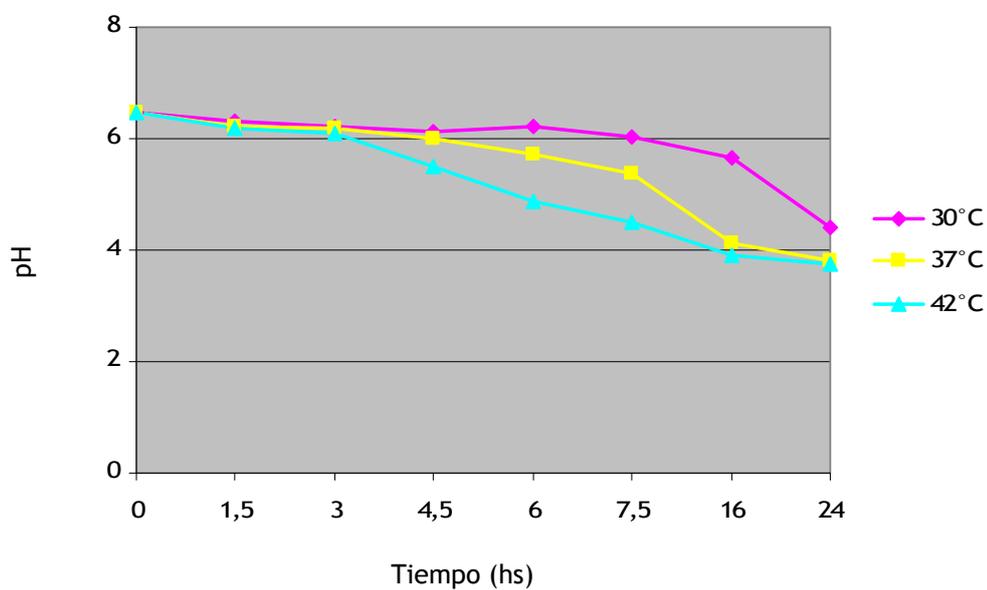


Fig. 13. Cinéticas de acidificación (pH) en caldo MRS por crecimiento de la cepa *Lb. helveticus* CNRZ 241 a diferentes temperaturas.



Tabla 9. Influencia del pH en la viabilidad de fagos liberados espontáneamente de la cepa lisógena *Lb. helveticus* CNRZ 241 (recuento inicial:  $2,2 \cdot 10^5$  UFP/ml)

pH	Recuento (UFP/ ml)	
	1 h	3 h
3,8	< 10	-
4,5	$4,5 \cdot 10^2$	< 10

#### 4.3.2. Influencia de la concentración de Mitomicina C en la liberación del profago CNRZ 0241.

La Fig. 15 muestra la evolución de los recuentos de partículas fágicas liberadas en función del tiempo para las 3 concentraciones de Mitomicina C ensayadas.

Como se observa, no existió una apreciable influencia de la concentración de Mitomicina C en la evolución de la tasa de liberación fágica de la cepa. Los valores máximos de recuentos alcanzaron niveles de  $6,9 \cdot 10^5$  UFP/ml a las 2,5 horas, luego, de lo cual se observó una disminución de los mismos. La Mitomicina C produce un cierto retardo en el crecimiento de la cepa (Fig. 16), proporcional a la concentración del antibiótico ensayado. En función de estos resultados, se adoptó  $0,5 \mu\text{g/ml}$  como la concentración útil para trabajar con esta cepa.

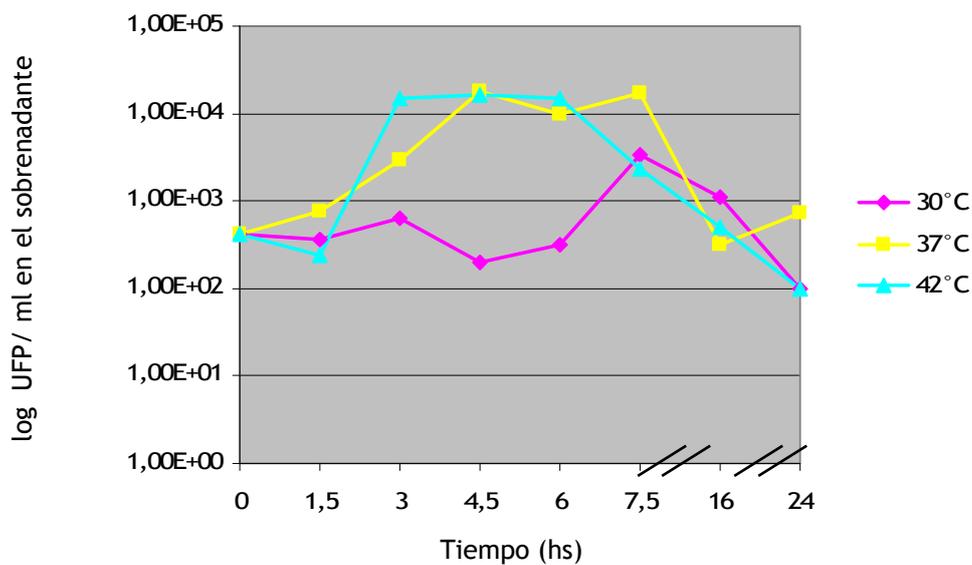


Fig. 14. Cinéticas de liberación espontánea de fagos a partir de la cepa lisógena *Lb. helveticus* CNRZ 241 a distintas temperaturas.

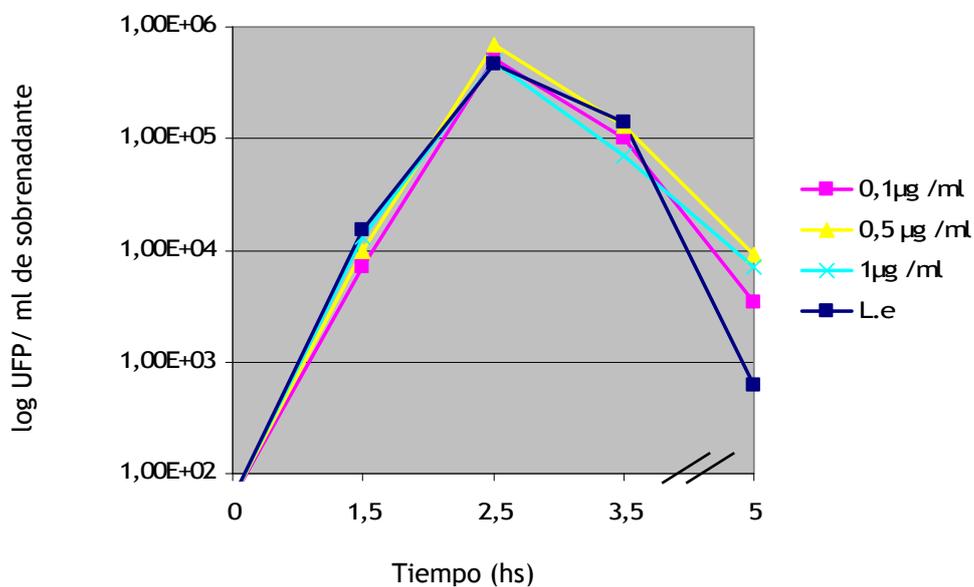


Fig. 15 Liberación de fagos activos por la cepa lisógena *Lb. helveticus* CNRZ 241 en presencia de diferentes concentraciones de Mitomicina C (Le: liberación espontánea).

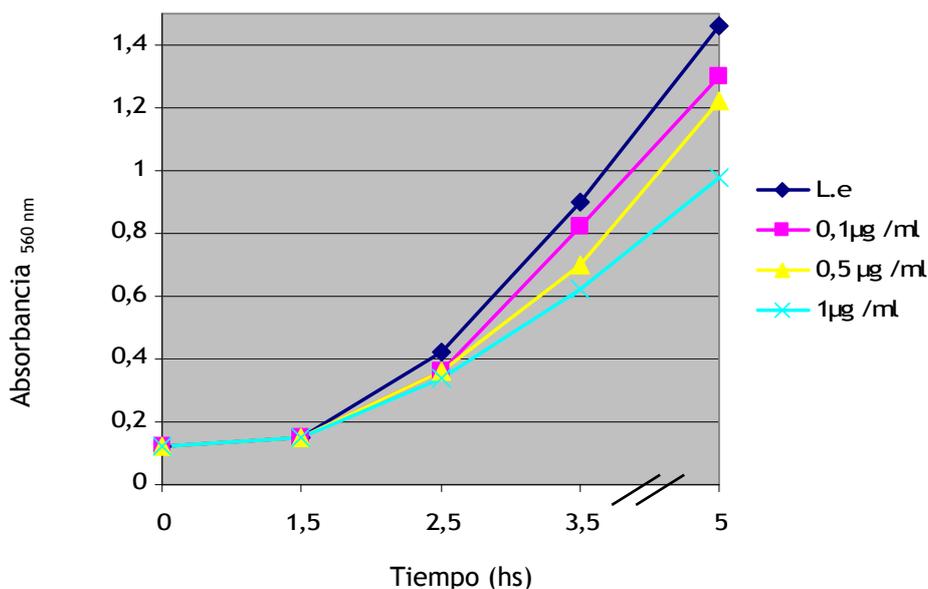


Fig. 16. Cinéticas de crecimiento de *Lb. helveticus* CNRZ 241 a 42°C en presencia de Mitomicina C (Le: liberación espontánea).

#### 4.4. DIFUSIÓN DE LISOGENIA EN *Lactobacillus delbrueckii*

##### 4.4.1. Inducción con Mitomicina C y aislamiento de fagos temperados

Todas las cepas testeadas en la inducción mostraron un descenso gradual en los valores de densidad óptica (D.O.<sub>560nm</sub>) (test de turbidez) cuando los cultivos fueron tratados con Mitomicina C, comparados con un control sin el antibiótico. Sin embargo, sólo fue posible encontrar cepas sensibles para 6 sobrenadantes tratados con Mitomicina C (37% del total de cepas testeadas). Después del tratamiento a 90°C, todos los sobrenadantes dieron señal negativa sobre las mismas cepas, demostrando la presencia de partículas virales activas o sustancias termosensibles (ej, bacteriocinas).

Fagos capaces de proliferar y lisar cepas indicadoras se encontraron en solo 3 sobrenadantes tratados con Mitomicina C (*Ll.* 192, *Ll.* 195, *L.l* Cb1; (Tabla 10). De la cepa comercial *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1 fue posible aislar partículas virales activas, las cuales fueron capaces de propagar sobre dos cepas hospedadoras, *Lb. delbrueckii* subsp.



*lactis* 204 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 342. Los fagos aislados y purificados se denominaron Cb1/204 y Cb1/342, según la cepa utilizada para propagarlos.

Tabla 10. Detección de partículas fágicas a partir de cepas de *Lb. delbrueckii* inducidas con Mitomicina C, usando diferentes metodologías.

Cepas inducidas <sup>(a)</sup>	Metodología		
	Spot test <sup>(b)</sup>		Test de turbidez <sup>(d)</sup>
	Inducción sin tratamiento térmico	Inducción con tratamiento térmico <sup>(c)</sup>	
<i>L. l</i> 192	+ ( <i>L. l</i> 219) **	-	+ ( <i>L. l</i> 209, 2°) **
<i>L. l</i> 193	+ ( <i>L. l</i> 218) **	-	-
<i>L. l</i> 195	+ ( <i>L. l</i> 219) **	-	+ ( <i>L. l</i> 209, 2°) **
<i>L. l</i> 197	-	-	-
<i>L. l</i> 200	-	-	-
<i>L. l</i> 203	-	-	-
<i>L. l</i> 204	-	-	-
<i>L. l</i> 217	-	-	-
<i>L. l</i> 254	-	-	-
<i>L. l</i> Cb1	-	-	+ ( <i>L. l</i> 204, 2°) ** + ( <i>L. b</i> 342, 3°) **
<i>L. b</i> c. 332	+ ( <i>L. l</i> 218) **	-	-
<i>L. l</i> M	-	-	-
<i>L. l</i> Gb2	-	-	-
<i>L. b</i> Hb2	-	-	-
<i>L. b</i> Eb4	+ ( <i>L. l</i> 218) **	-	-
<i>L. b</i> Bb1	-	-	-

<sup>(a)</sup> 0,5 µg/ml Mitomicina; <sup>(b)</sup> Agar MRS-Ca; <sup>(c)</sup> 15 min- 90°C; <sup>(d)</sup> Caldo MRS-Ca

( ) \*\* Cepas sensibles

( ) \* Cepas sensibles, número de subcultivo cuando se observó lisis

*L. l*: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*; *L. b*: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*



#### 4.4.2 Características morfológicas de los fagos temperados aislados

Los fagos temperados Cb1/204 y Cb1/342 mostraron cabezas prolatas con colas largas no contráctiles con estrías transversales (Fig. 18.). Las dimensiones de ambos fagos fueron similares, mostrando cápsides de  $125 \pm 2$  nm de longitud y  $58 \pm 2$  nm de ancho, y colas de  $334 \pm 3$  nm de longitud y  $12 \pm 0.5$  nm de ancho.

Estos fagos se clasificaron como miembros de la familia *Siphoviridae* (morfotipo B1) (Matthews y col., 1982), correspondiente al Grupo B de Bradley (1967). De acuerdo a esta morfología, estos fagos pertenecen al grupo *c* (fagos de cabeza prolata), según la clasificación de fagos de *Lb. delbrueckii* (Sechaud y col., 1988).



Fig.18. Micrografías electrónicas de los fagos temperados de cabeza prolata Cb1/204 (A) y Cb1/342 (B), aislados de la cepa comercial *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1. Las barras al pie de las fotos corresponden a 50 nm.

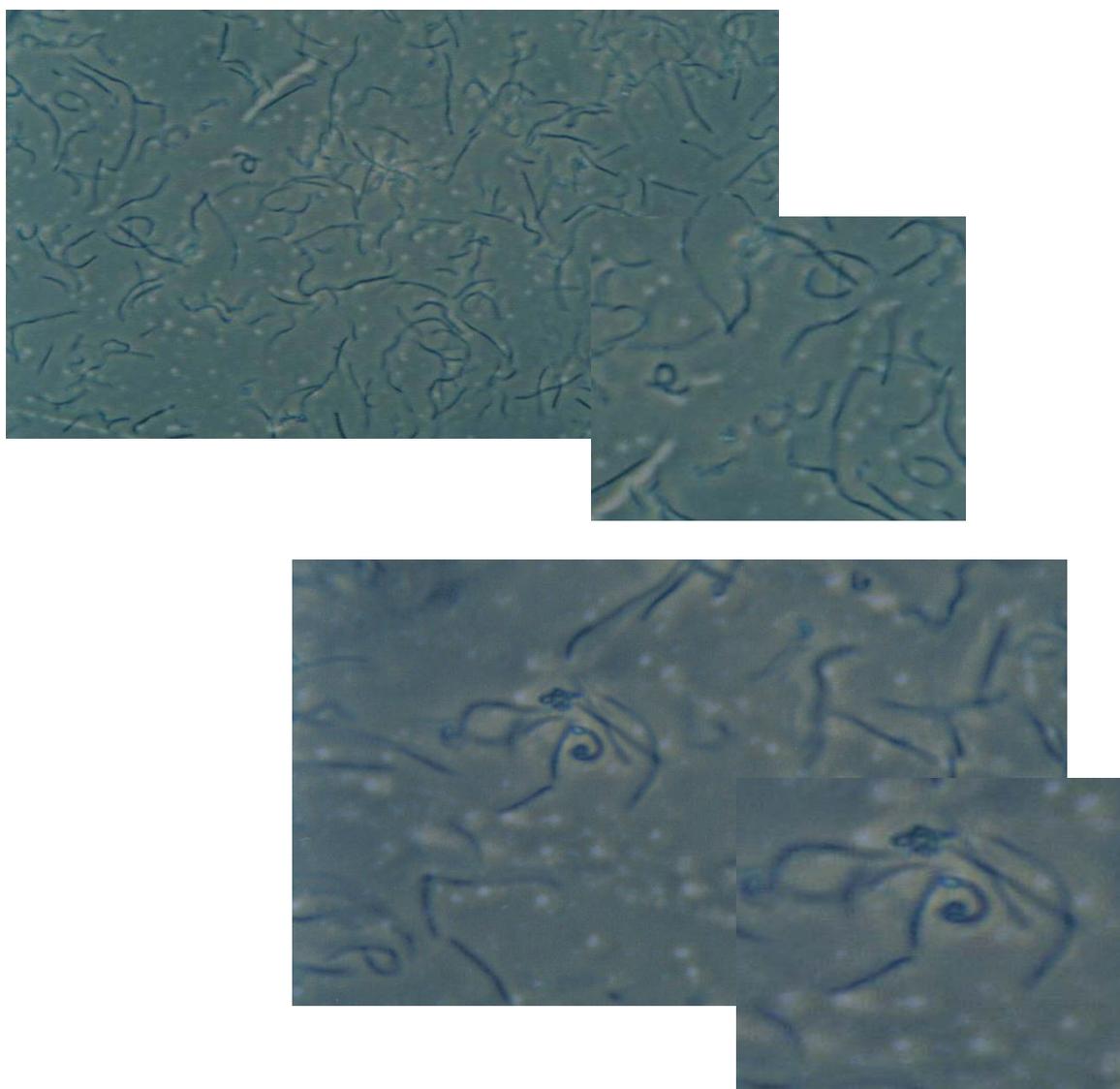


#### 4.5. Heterogeneidad celular y fagorresistencia en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>

---

##### 4.5.1. Obtención de variantes morfológicas

Observándose un cultivo overnight en caldo MRS (42°C) de la cepa en microscopio de contraste de fases (1000x) se evidenció claramente la existencia de morfologías celulares diferenciadas: bacilos regulares en cadenas rectas y bacilos en cadenas curvas, algunas enrolladas. (Fig. 18).



---

Fig.18. Observación microscópica en *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> (gota fresca, contraste de fases, 1000x).



Cuando éste cultivo se estrió en la superficie de cuatro medios agarizados (MRS, TSA, LAPT10<sub>6</sub> y 1006M) y las placas se incubaron 48 h a 42 °C, se reveló, con mayor o menor claridad según el medio de cultivo, la existencia de colonias con diferentes características (Figs. 19. y 20. ).

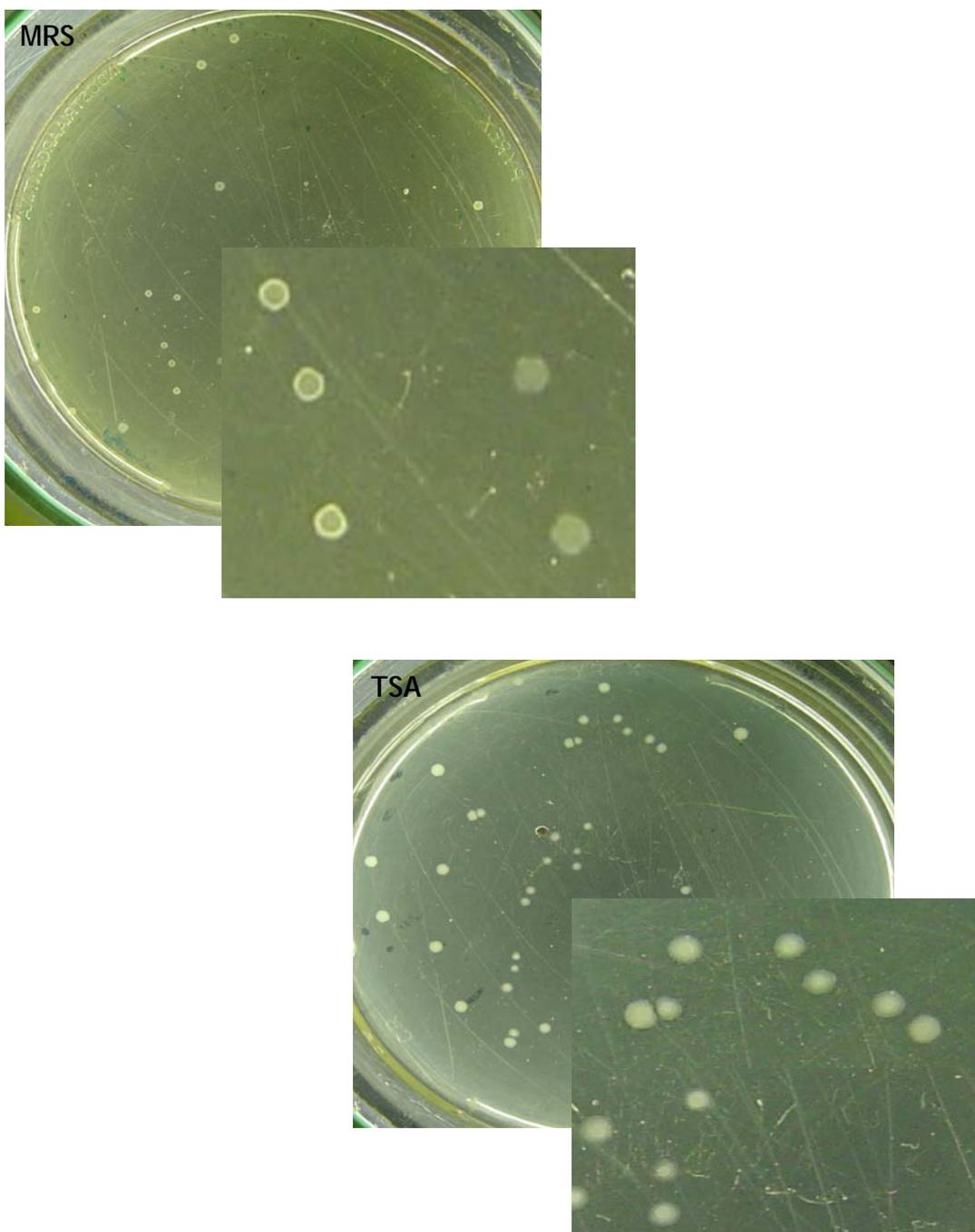
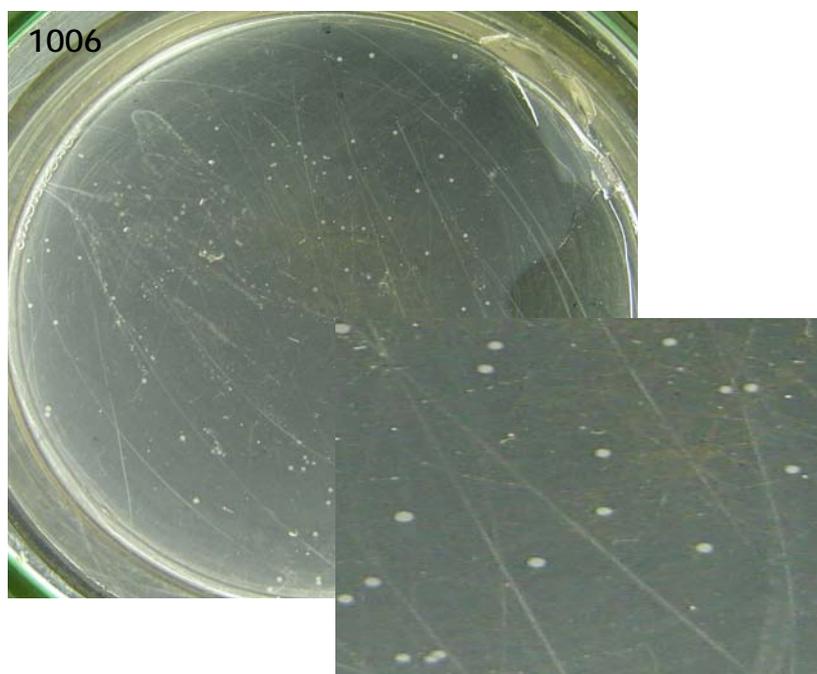


Fig. 19. Colonias obtenidas a partir de un estriado de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> , en Agar MRS y Agar TSA. -



---

Fig. 20. Colonias obtenidas a partir de un estriado *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>,  
en agar LAPTg y Agar 1006.-



#### 4.5.2. Caracterización de la morfología celular y de las colonias

- Agar MRS: se evidenció la presencia de dos tipos de colonias , unas con bordes definidos, opacas y otras sin bordes definidos, transparentes.
- Agar TSA: se observaron también dos tipos de colonias, con anillo externo o sin este.
- Agar LAPtg: en este medio se distinguieron colonias circulares y otras irregulares.
- Agar 1006: aquí se observó un solo tipo de colonia, las cuales presentaban formas circulares, de borde liso, muy pequeñas y blancas.

Debido a que la heterogeneidad morfológica de las colonias resultó más evidente en agar MRS, los estudios posteriores se realizaron en este medio. Las colonias circulares, opacas y cremosas, se denominaron C, y las colonias transparentes y de bordes irregulares, se denominaron T.

Cuando las variantes C y T se cultivaron overnight en caldo MRS (42°C), se revelaron como bacilos en cadenas curvas (colonias C) y bacilos rectos en cadenas (colonias T) al microscopio de contraste de fases (1000x).

La Tabla 11 muestra los recuentos parciales de colonias C y T obtenidas en 3 ensayos (siembra en superficie, agar MRS 48 horas a 42 °C). Se observa que las variantes C constituyeron aproximadamente el 80-85 % de las colonias obtenidas y las variantes T, el 15-20 % restante.

Tabla 11. Recuento diferencial de variantes morfológicas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> en agar MRS

(48 h, 42°C).

VARIANTE MORFOLOGICA	ENSAYO 1		ENSAYO 2		ENSAYO 3	
	UFC/ml	% Parcial	UFC/ml	% Parcial	UFC/ml	% Parcial
C	7,8 10 <sup>7</sup>	82,1	3,5 10 <sup>8</sup>	79,5	1,80 10 <sup>8</sup>	84,5
T	1,7 10 <sup>7</sup>	17,8	9 10 <sup>7</sup>	20,4	3,3 10 <sup>7</sup>	15,5



#### 4.5.3. Obtención de variantes fagorresistentes

Se realizaron estriados de cultivos overnight de ambas variantes morfológicas y se incubaron 48 hs a 42 °C. A partir de estas placas se levantaron 2 colonias de cada variante ( $Ab_1 C / Ab_1 C'$  y  $Ab_1 T / Ab_1 T'$ ), que se incubaron luego en caldo MRS. Las características de las colonias y su morfología celular se muestran en las Figs. 21-23 y Tabla 12.

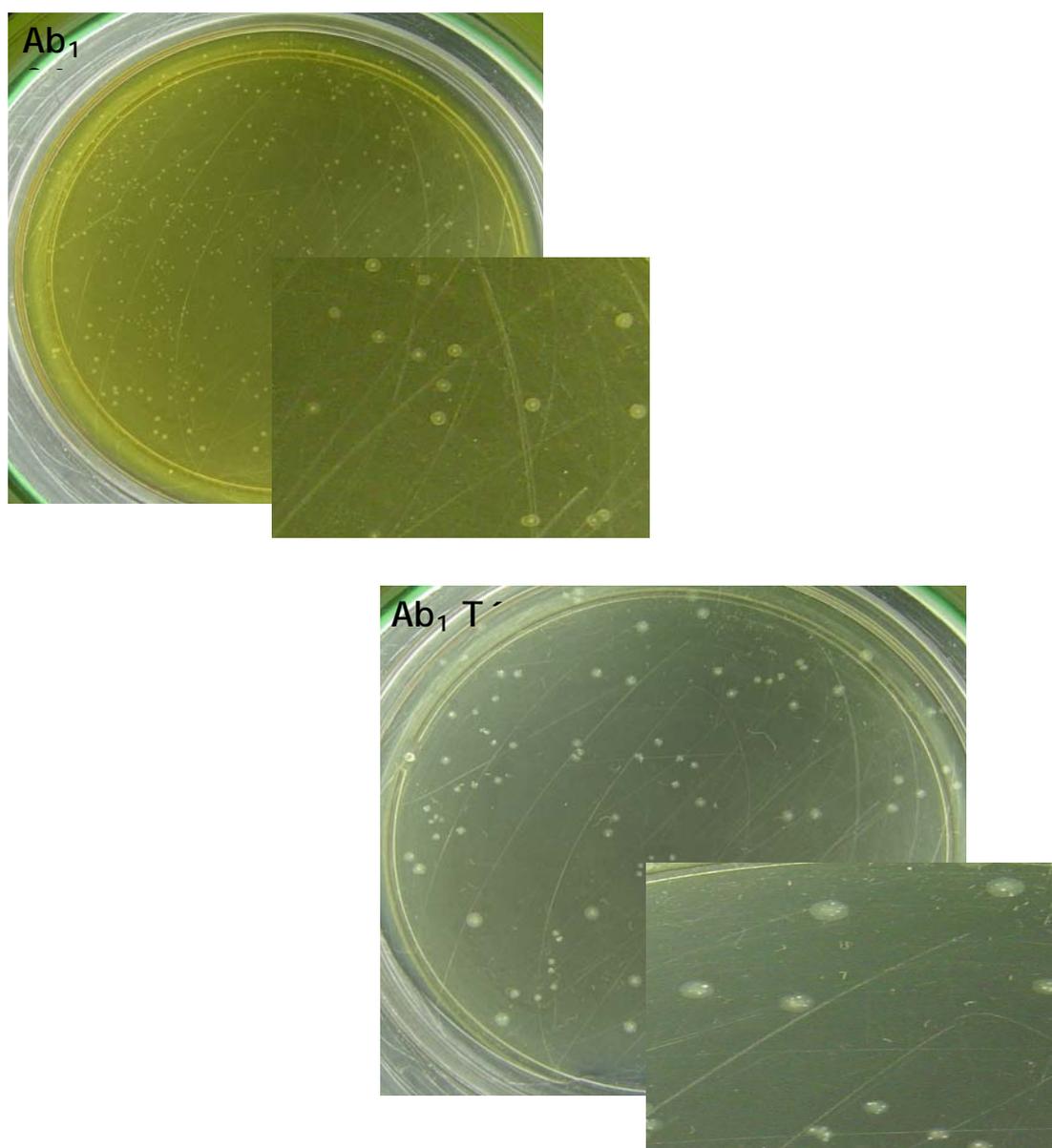


Fig. 21 Observación macroscópica de colonias de cada variante de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*  $Ab_1$  ( $Ab_1 C' / Ab_1 T'$ ).



Tabla 12 Observación macroscópica y microscópica de las colonias aisladas de cada variante morfológica (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>, C y T).

Variantes	Observación macroscópica	Observación microscópica
Ab <sub>1</sub>	Colonias blancas, cremosas y colonias transparentes de bordes no definidos	Bacilos regulares en cadenas cortas. Algunos rulos y/o espirales
Ab <sub>1</sub> C	Colonias brillantes blancas, bordes definidos	Bacilos regulares en cadenas cortas
Ab <sub>1</sub> C'	Colonias brillantes blancas, bordes definidos	Bacilos regulares en cadenas cortas
Ab <sub>1</sub> T	Colonias transparentes, bordes irregulares	Bacilos regulares curvos largos
Ab <sub>1</sub> T'	Colonias transparentes, bordes irregulares	Bacilos regulares curvos largos

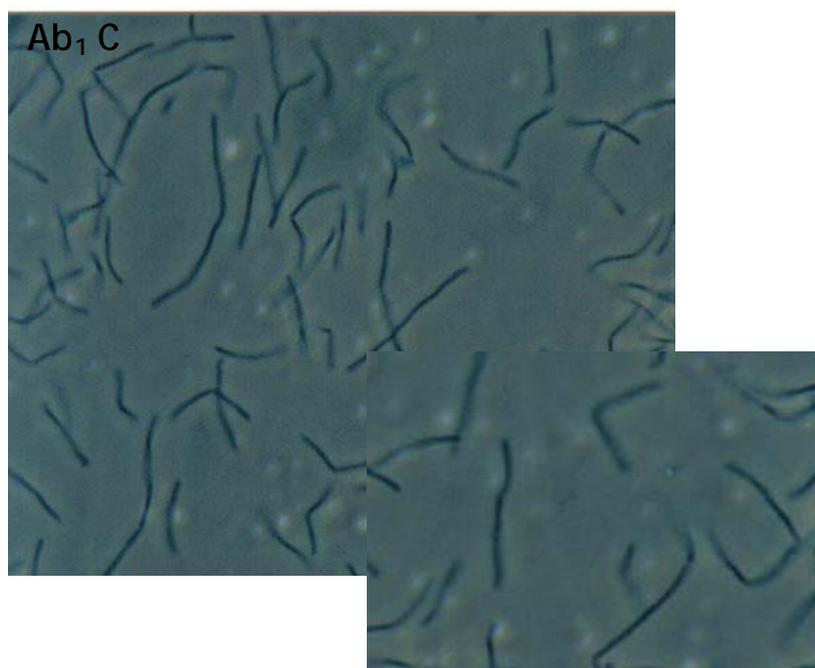


Fig. 22 Observación microscópica de la variante Ab<sub>1</sub> C de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>.

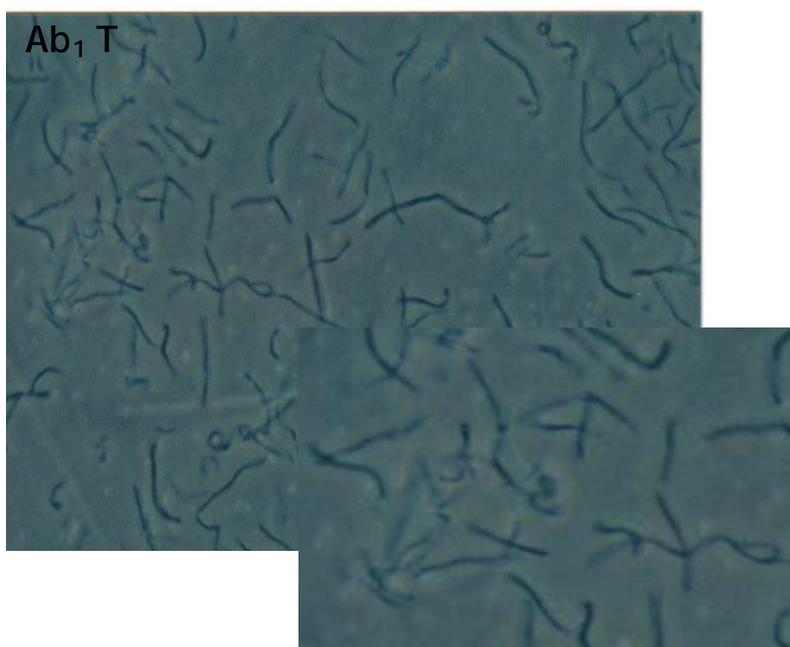


Fig. 23 Observación microscópica de la variante Ab<sub>1</sub> T de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>.

Cuando la cepa de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> se enfrentó al fago YAB, demostró ser sensible (lisis en el 1° repique). Si bien ésta lisis en caldo fue rápida y evidente, no resultó completa ya que fue posible constatar en repetidos ensayos, la presencia de un residuo celular que no lisa, aun prolongando la incubación. Partiendo de una población celular máxima alcanzada en un cultivo líquido de  $2,1 \cdot 10^8$  UFC/ml, el residuo celular resistente cuantificado resultó de  $2,0 \cdot 10^4$  UFC/ml, esto es aproximadamente el 0.01 % de la población celular total.

De las placas de recuento del residuo celular presuntamente fagorresistente, se levantaron 19 colonias de cada variante de la más alta dilución sembrada, que se enfrentaron al fago YAB, a fin de obtener derivados verdaderamente resistentes. En este ensayo de sensibilidad, solo 4 de estas colonias (1 de la variante morfológica C y 3 de la variante morfológica T) resultaron verdaderamente resistentes, esto es el 10,5 % del total de las colonias. Teniendo en cuenta que el residuo de la población celular presuntamente resistente era del 0,01 %, el 10,5% de este valor nos daría la fracción de la población celular confirmada como resistente al fago YAB: 0,001%

Los cuatro derivados fagorresistentes obtenidos de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> se identificaron como Ab<sub>1</sub>C<sub>a</sub>, Ab<sub>1</sub>T<sub>b</sub>, Ab<sub>1</sub>T<sub>b1</sub> y Ab<sub>1</sub>T<sub>b2</sub>.



#### 4.5.4. Caracterización de la fagorresistencia

La Tabla 13. muestra algunas características relacionadas con la resistencia fágica para las variantes mencionadas. Las variantes morfológicas C y T de la población celular resultaron sensibles al fago YAB, con valores de EOP cercanos a 1 y con altas tasas de adsorción fágica ( $\geq 95\%$ ), al igual que la cepa madre.

Por su parte, las variantes resistentes mostraron muy bajos valores de EOP ( $< 10^{-7}$ ), lo que habla de un muy alto valor de resistencia. La estabilidad de este fenotipo resultó también muy alta para las variantes T, puesto que resistieron sin lisar hasta el 7<sup>mo</sup> repique en el ensayo. En cambio, la única variante C lisó en el 4<sup>to</sup> repique, demostrando menor estabilidad.

Tabla 13. Características de la fagorresistencia de las variantes (morfológicas y fago-resistentes) obtenidas para la cepa *Lb. lactis* Ab<sub>1</sub>.

Cepa Variante	EOP <sup>a</sup>	Sensibilidad en medio líquido	Estabilidad de la fagorresistencia <sup>b</sup>	Tasa de adsorción <sup>c</sup> (%)	Mecanismo de resistencia intracelular
Ab <sub>1</sub>		+		99	
Ab <sub>1</sub> C	1.07	+		95	
Ab <sub>1</sub> T	0.80	+		99	
Ab <sub>1</sub> C <sub>a</sub>	$< 10^{-7}$	-	+(4°)	93	si
Ab <sub>1</sub> T <sub>b</sub>	$< 10^{-7}$	-	-	15	
Ab <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	$< 10^{-7}$	-	-	13	
Ab <sub>1</sub> T <sub>b2</sub>	$< 10^{-7}$	-	-	0	

<sup>a</sup>: recuento fágico sobre variante/recuento fágico sobre cepa madre

<sup>b</sup>: lisis (+) o ausencia de lisis (-) hasta el 7° repique (n): número de repique en el que se produjo la lisis.

<sup>c</sup>: % de fagos adsorbidos luego de 30 min a 42°C

Los valores de adsorción obtenidos fueron altos ( $> 95\%$ ) para ambas variantes T y C. Para las variantes T (Ab<sub>1</sub>T<sub>b</sub>, Ab<sub>1</sub>T<sub>b1</sub> y Ab<sub>1</sub>T<sub>b2</sub>), los valores fueron  $\leq 15\%$  mientras que para la única variante C los valores de adsorción fueron del 93%, similar a lo encontrado en la cepa madre. Este último resultado, combinado con los correspondientes a los ensayos de



estabilidad (lisis en el 4<sup>to</sup> repique), nos permite sugerir la presencia de un sistema fagorresistente (tipo restricción/modificación).

#### 4.5.5. Caracterización bioquímica de las variantes morfológicas y fagorresistentes

Las variantes morfológicas y fagorresistentes, del tipo C y T mostraron un perfil de fermentación de azúcares (galerías API) idéntico al de la cepa madre (Figs. 24-26.).

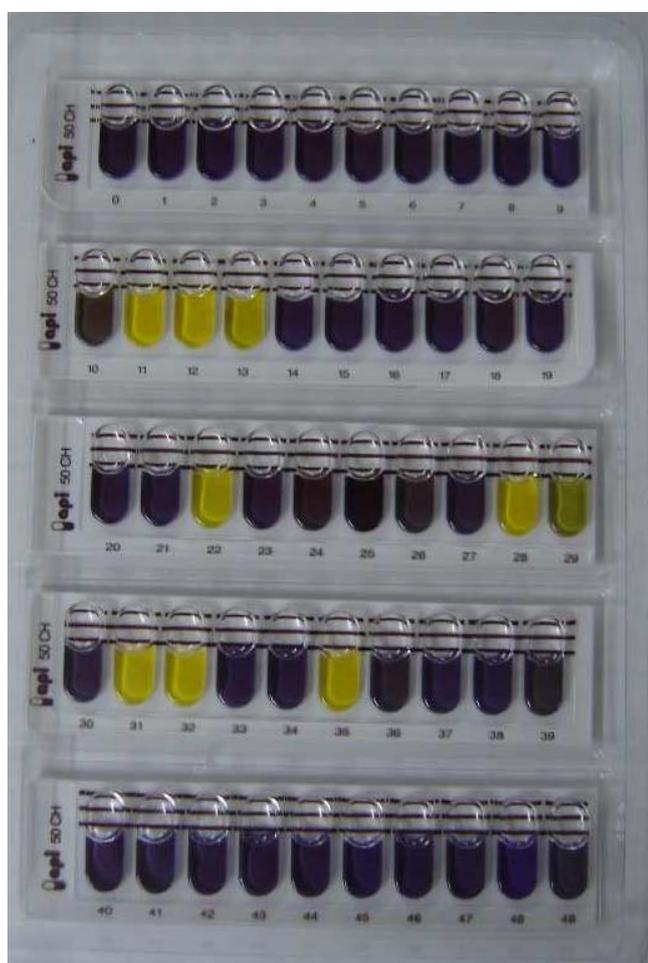
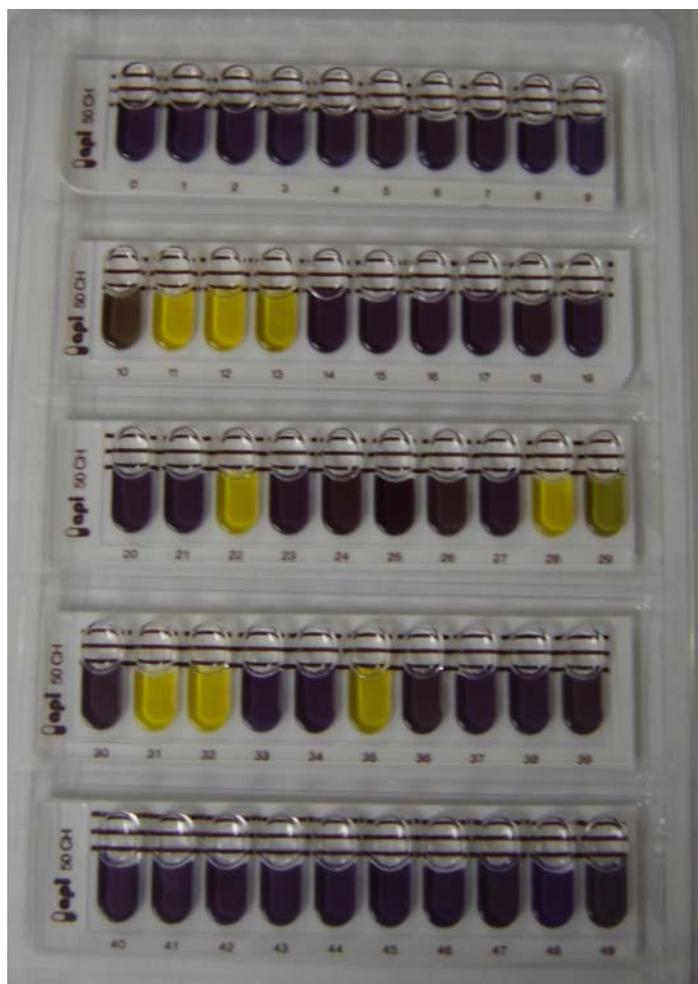


Fig. 24 Perfil fermentativo de azúcares (API) de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>.



---

Fig. 25 Perfil fermentativo de azúcares (API) de la variante morfológica y fagorresistente *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>C.



---

Fig. 26 Perfil fermentativo de azúcares (API) de la variante morfológica y fagorresistente *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>T.



#### 4.5.6. Caracterización genética de las variantes morfológicas y fagorresistentes

Los estudios realizados por PCR-ARDRA sobre la cepa madre, sus variantes morfológicas y sus variantes fagorresistentes, confirman la identidad de las mismas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Figs. 27).

Antes de realizar la restricción con *EcoRI*, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1,5 kpb para todas las cepas, la hospedadora Ab<sub>1</sub> y todas sus cepas mutantes Ab<sub>1</sub>C<sub>a</sub>, Ab<sub>1</sub>T<sub>b</sub>, Ab<sub>1</sub>T<sub>b1</sub> y Ab<sub>1</sub>T<sub>b2</sub>, así como también para las dos cepas tipo *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315<sup>T</sup> y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842<sup>T</sup>. Luego de la digestión con la endonucleasa *EcoRI*, se observó una clara diferencia entre los perfiles obtenidos para las subespecies *lactis* y *bulgaricus*. Para las cepa madre y sus mutantes se obtuvo una banda de aproximadamente 1.4 kbp, compatible con la subespecie *lactis*.

El dendrograma obtenido usando los oligonucleótidos M13 y 1254 se muestra en la Fig. 28. Los resultados mostraron un coeficiente de similitud superior al 95% entre la cepa madre *L. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> y sus derivados (morfológicos y fagorresistentes). Este hecho es una confirmación de que los clones aislados derivan ciertamente de la cepa en estudio.

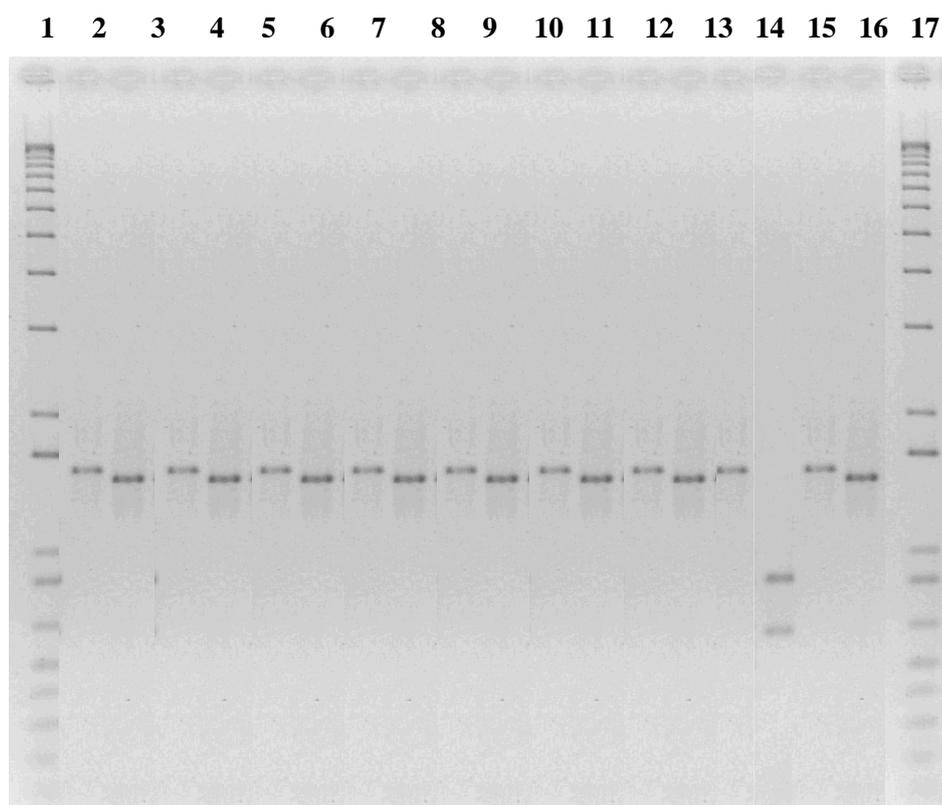


Fig. 27 16S rRNA ARDRA de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>, sus variantes morfológicas y fagorresistentes, digeridas (líneas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) y no digeridas (líneas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14) con la enzima de restricción *Eco*RI. Líneas 2 y 3: Ab<sub>1</sub>, líneas 4 y 5: Ab<sub>1</sub>C, líneas 6 y 7: Ab<sub>1</sub>T, líneas 8 y 9: Ab<sub>1</sub>C<sub>a</sub>, líneas 10 y 11: Ab<sub>1</sub>T<sub>b</sub>, líneas 12 y 13: Ab<sub>1</sub>T<sub>b1</sub>, líneas 14 y 15: Ab<sub>1</sub>T<sub>b2</sub>, líneas 16 y 17: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842<sup>T</sup>, líneas 18 y 19: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315<sup>T</sup>, líneas 1 y 18: marcador de peso molecular 1 kbp Plus Ladder.

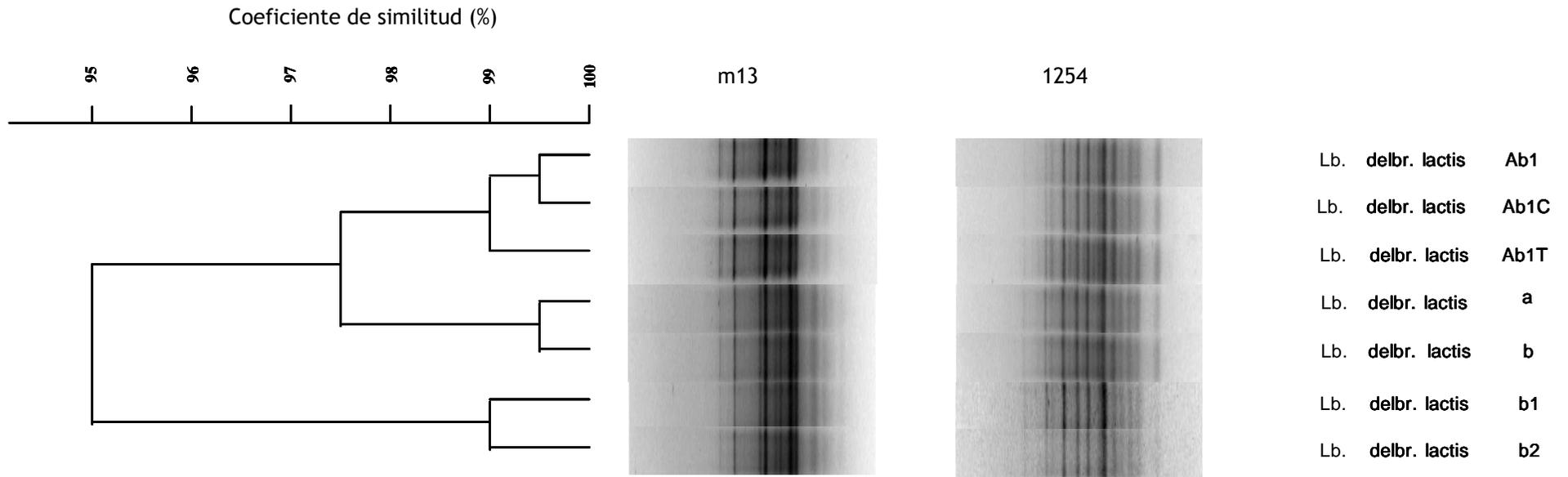


Fig. 28 Dendrograma obtenido a partir de los perfiles RAPD-PCR de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* Ab<sub>1</sub> y sus variantes morfológicas ( Ab<sub>1</sub>C y Ab<sub>1</sub>T) y fagorresistentes (a, b, b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub>), con los primers M13 y 1254.



#### 4.5.7. Caracterización tecnológica de las variantes morfológicas y fagorresistentes

La Tabla 14 muestra algunos parámetros tecnológicos determinados para las variantes morfológicas y fagorresistentes de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> y su comparación con los de esta cepa.

Tabla 14 Caracterización tecnológica de las variantes (morfológicas y fagorresistentes) obtenidas (valores promedio de tres determinaciones)

Cepa/Variante	pH <sup>a</sup>	Actividad acidificante <sup>b</sup>	Actividad proteolítica <sup>c</sup>
Ab <sub>1</sub>	3,82±0,05	1,26±0,10	0,387±0,038
Ab <sub>1</sub> C	4,00±0,08	1,26±0,11	0,346±0,041
Ab <sub>1</sub> T	3,96±0,04	1,26±0,08	0,387±0,032
Ab <sub>1</sub> C <sub>a</sub>	4,50±0,05	0,84±0,05	0,301±0,020
Ab <sub>1</sub> T <sub>b</sub>	4,92±0,04	0,82±0,08	0,318±0,031
Ab <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	5,39±0,07	0,67±0,10	0,191±0,023
Ab <sub>1</sub> T <sub>b2</sub>	3,92±0,05	1,30±0,09	0,474±0,029

<sup>a</sup>: medido en LDR después de 24 h a 42 °C

<sup>b</sup>: % de ácido láctico medido después de 24 h a 42 °C en LDR

<sup>c</sup>: absorbancia(340 nm), medida después de 24 h a 42 °C en LDR

Las variantes morfológicas (Ab<sub>1</sub> C y Ab<sub>1</sub> T) se comportaron tecnológicamente como la cepa madre en cuanto a su capacidad acidificante y proteolítica, mostrándose como cepas “rápidas” (fast). En cambio, las variantes fagorresistentes (a excepción de Ab<sub>1</sub> T<sub>b2</sub>) tuvieron una performance menos eficiente creciendo en leche, puesto que resultaron menores la actividad acidificante (entre 0,67 y 0,84% ácido láctico), el pH alcanzado a las 24 h (entre 4,50 y 5,39) y la actividad proteolítica (A<sub>340</sub> de entre 0,191 y 0,318), en relación a la cepa madre (valores de 1,26 % ácido láctico, pH: 3,82 y A<sub>340</sub> = 0,387, respectivamente).

Por su parte, la variante fagorresistente Ab<sub>1</sub> T<sub>b2</sub> resultó la más interesante ya que mantuvo las características tecnológicas de la cepa madre mostrando, incluso, mayor actividad proteolítica.



**discusión**

---



---

Los ataques fágicos causan la destrucción de las células bacterianas y de esta manera constituyen una interferencia importante en los procesos industriales que utilizan bacterias lácticas, al disminuir o bloquear su capacidad acidificante (Sechaud y col., 1988). La actividad acidificante de las bacterias lácticas es la propiedad de mayor importancia desde el punto de vista industrial y, junto a la actividad proteolítica, orienta la selección de los fermentos de acuerdo a las características del producto final (Suárez y col., 2002).

La industria láctea ha utilizado tradicionalmente muchos métodos físicos y biológicos para combatir los problemas relacionados con fagos, desde la implementación de condiciones asépticas de proceso hasta la utilización de regímenes de rotación de cepas pero, todavía, la eficacia de estas precauciones está limitada por las propiedades evolutivas dinámicas de los fagos (Forde y Fitzgerald, 1999).

Mientras que los fagos líticos concitan la mayor atención cuando se habla del uso de bacterias lácticas en fermentaciones industriales, existe también un interés significativo de los fagos que pueden entrar en una relación alternativa, como lo es el ciclo lisogénico, en sus huéspedes. En este caso, el genoma fágico, luego de la inyección dentro del blanco celular, se integra por recombinación (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). El estado lisogénico de las bacterias lácticas es considerado la principal fuente de bacteriófagos en los ambientes industriales. Los fagos temperados pueden interferir en el normal proceso de fermentación cuando, por inducción espontánea, se liberan al medio e infectan cepas sensibles presentes en los cultivos starters (Davidson y col., 1990). Las consecuencias de este hecho se vuelven evidentes cuando se utilizan los starters comerciales, ya que están compuestos por un bajo número de cepas.

Bacterias y fagos están relacionados por una larga historia de co-evolución y elementos de profagos se han encontrado en la mayoría de las BAL. A su vez, la diversificación fágica esta liderada por la acumulación de mutaciones puntuales, disrupción genética y recombinación. Esta situación ha derivado en el desarrollo de mecanismos de defensa en las bacterias contra los ataques fágicos (Josephsen y Neve, 2004; Labrie y Moineau, 2007).



♦ *Streptococcus thermophilus* es la bacteria láctica termófila mas utilizada en la industria láctea argentina, en forma aislada o asociada a otras especies, tanto para la obtención de diversos tipos de quesos como de leches fermentadas (Reinheimer y col., 1997 y Suárez y col., 2002). En el presente trabajo, los ensayos de difusión de la fagorresistencia entre cepas autóctonas de esta especie indicaron una alta resistencia frente a los tres fagos argentinos ensayados (CYM, YCS y T7). Por otra parte, se pudo cuantificar el nivel de resistencia de las cepas a través del EOP. Cabe destacar que para la mayoría de los casos, no se observaron placas de lisis cuando se tituló la suspensión fágica sobre las cepas estudiadas, obteniéndose valores de EOP inferiores al limite de detección y evidenciándose un alto nivel de resistencia en todas las cepas frente a los 3 fagos específicos usados. Binetti y col. (2007), analizando mutantes espontáneos fagorresistentes de *S. thermophilus*, destacaron que para la mayoría de los casos estudiados, no se observaron placas de lisis cuando se tituló la suspensión fágica sobre los mismos, obteniéndose valores de EOP inferiores al limite de detección. Sólo para aquellos mutantes derivados de las cepas *St.* 12.5 (fago 031) y *St.* I53 (fago 53), fue posible la formación de placas de lisis. No obstante, los títulos obtenidos resultaron inferiores a los determinados sobre sus cepas sensibles en, aproximadamente, 6 ordenes logarítmicos (valores promedio se EOP=  $1,7 \cdot 10^{-6}$  en ambos casos), evidenciando un nivel de resistencia medio, de acuerdo al criterio de clasificación de Moineau (1999). Teniendo en cuenta esta clasificación, la mayor parte de los mutantes aislados mostró un nivel de resistencia fágica fuerte (EOP variable entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$ ). Las 14 cepas de *S. thermophilus* estudiadas en el presente trabajo de tesis, frente a los 3 fagos autóctonos demostraron una alta estabilidad del fenotipo fagorresistencia, ya que 11 de ellas (80% del total de cepas) mantuvieron la resistencia luego de 7 repiques sucesivos bajo elevada presión de sus fagos específicos. Estudios previos sobre estreptococos informan que las cepas estudiadas resisten firmemente al ataque de todos los fagos conocidos y mantienen esta resistencia durante considerables periodos de tiempo, aún bajo las peores condiciones de manufactura comercial (Klaenhammer, 1984).

A partir de los resultados obtenidos para establecer los mecanismos de fagorresistencia presentes en las cepas de *S. thermophilus* estudiadas por nosotros pudo concluirse que de los



---

42 ensayos realizados, en el 71% de ellos se detectó una baja tasa de adsorción (< 25% de partículas virales adsorbidas) mientras que el 19% de dichos ensayos mostró valores superiores comprendidos entre el 40% y el 73%. Correlacionando los resultados en medio líquido con los valores de adsorción, se observó que los sistemas fago/cepa de *S. thermophilus* con adsorción disminuida fueron resistentes por interferencia en la adsorción, mientras que en los restantes (adsorción > 25 %) se sugiere la participación de mecanismos de fagorresistencia intracelulares. Viscardi y col. (2003 a, b), utilizando citometría de flujo, aislaron variantes fagorresistentes de *S. thermophilus*, las cuales mostraron un bloqueo en la adsorción. En la mayoría de los casos estudiados por Binetti y col. (2007) se observó una adsorción normal de las partículas fágicas a los mutantes fagorresistentes, con excepción de aquellos aislados a partir de las cepas *St.* 554 (fago 54) y *St.* MIC7 (fago Mi1), en los que se evidenció una inhibición de la adsorción luego de 30 minutos de incubación en presencia del fago específico. Para la variante fagorresistente de *St.* 12.5 (fago 031), identificada como *St.* R5031-10 se verificó la presencia de mecanismos de tipo R/M, mientras que en el caso de ciertos mutantes de la cepa *St.* I53 (fago 53), se puso en evidencia un mecanismo aparentemente combinado de varios R/M. Un caso muy interesante fue descrito por Callegari (1999) para *S. thermophilus* T003, sensible al fago sst3. Debido a la gran importancia tecnológica de la cepa se aislaron mutantes fago resistentes, identificándose entre ellos uno en particular, denominado T039. Esta cepa mostró, como única diferencia con la cepa madre, poseer un plásmido de 9,6 Kb, mientras que aquella contiene 2 plásmidos (de 3,3 Kb y 6 Kb). Se demostró que el plásmido de mayor tamaño era el resultado de la integración de los dos plásmidos nativos, la cual hacía posible la obtención de un gen funcional, que codificaba para una subunidad proteica integrante del sistema R/M, responsable de la especificidad del mismo, y que en última instancia era la responsable de la resistencia al fago.

◆ De las especies de bacterias lácticas, el ataque por bacteriófagos más denunciado a nivel mundial es indudablemente sobre *Lactococcus lactis*. Debido al significado económico que esta especie representa, importantes investigaciones han sido conducidas a caracterizar los fagos de lactococos aislados y los mecanismos que protegen a



---

las células de lactococos de las infecciones fágicas (Dinsmore y Klaenhammer, 1995; Josephsen y Neve, 2004 ; Deveau y col, 2006).

Los ensayos realizados en esta tesis sobre difusión de la fagorresistencia en cepas salvajes de *L. lactis* demostraron que las cepas usadas fueron resistentes a los 5 fagos autóctonos utilizados (QF12, QP4, QF9, CHD y 046) manifestando ausencia de lisis del cultivo hasta el 3° repique consecutivo. Asimismo, también se pudo cuantificar el nivel de resistencia de las cepas, el cual reveló la no formación de placas de lisis cuando fueron empleadas suspensiones fágicas de alto título, determinando un alto nivel de resistencia de todas las cepas frente a los 5 fagos específicos usados. En todos los casos el valor del EOP fue  $< 10^{-8}$ . En relación a la estabilidad de la fagorresistencia, todas las cepas se mantuvieron resistentes hasta el 7° repique a excepción de una (*L.l.* 166) que frente al fago QF12 mostró lisis en el 3° repique. En cuanto a los mecanismos de fagorresistencia presentes, el ensayo de adsorción llevado adelante con el fago QF12, presentó en todos los casos valores superiores al 87% que junto a la elevada resistencia fágica indican que las cepas de *L. lactis* poseen mecanismos intracelulares de resistencia fágica altamente efectivos (posiblemente combinación de R/M y Abi).

Valyasevi y col. (1990) estudiaron la composición de pared de *L. lactis* subsp. *cremoris* KH, sensible al fago kh, comparándola con la de mutantes resistentes de dicha cepa. Encontraron diferencias cuantitativas entre los componentes hidrogenocarbonatos de la pared, lo que sumado a estudios con lectinas específicas y enzimáticos, permitieron concluir que una menor cantidad de residuos de galactosa en la pared parecía ser la responsable de la resistencia a la infección en los mutantes. La hipótesis propuesta fue que la galactosa estaría formando parte directa del receptor para el fago o ubicaría a éste en la conformación espacial adecuada para permitir la unión.

En la adsorción de varios fagos de *L. lactis* subsp. *cremoris* E8, se comprobó que el componente de pared involucrado era el LAM (Loosely Associated Material) que a su vez tenía diferencias significativas con el de la cepa resistente 398. En estos mutantes, el contenido de LAM de la pared fue entre 2 a 3 veces mayor que en la cepa E8, con un aumento porcentual en las cantidades de ramnosa y galactosa. La sobreproducción de esta material enriquecido



---

en ciertos hidratos de carbono estaría inactivando los fagos antes que éstos contacten con sus receptores (Gopal y Crow, 1993). Un incremento similar en el contenido de galactosa y ramnosa, esta vez en la pared celular de *L. lactis* subsp. *cremoris* UC503, fue asignado como responsable de la resistencia a fagos homólogos. La información genética que codifica la síntesis de este polímero de pared se encontró ubicada en un plásmido (Dinsmore y Klaenhammer, 1995; Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

En *L. lactis* subsp. *cremoris* SK110, cepa resistente al bacteriófago sh11g, se comprobó que el aumento en la hidrofobicidad superficial así como en el contenido de galactosa de la pared celular, con respecto a la cepa sensible SK112, sería responsable de la resistencia y que dicha modificación parece tener codificación plasmídica. El mecanismo propuesto le asigna a la galactosa un rol enmascarante del receptor, formando parte de un polímero, ya que con la reducción de contenido del monosacárido por tratamientos diferenciales, se pierde la resistencia (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994).

Se han acumulado evidencias que sugieren la existencia de elevados niveles de resistencia fágica entre algunas cepas de *Lactococcus lactis*. Las mayores barreras contra el ataque fágico han sido identificadas como múltiples sistemas de R/M y mecanismos codificados en plásmidos que bloquean la adsorción fágica o la maduración de fagos líticos (Klaenhammer, 1984 ; Coffey y Ross, 2002).

◆ *Lactobacillus helveticus* es una de las especies menos caracterizada dentro de las bacterias lácticas termófilas a pesar de su gran importancia tecnológica en países como Italia y Argentina donde la producción de quesos duros está basada en el uso de esta especie que aparece como predominante en los cultivos naturales de suero (Bottazzi, 1981; Reinheimer y col., 1995).

El fenómeno de lisogenia ha sido estudiado en esta especie por investigadores italianos (Carminati y col., 1997). En este trabajo de tesis se caracterizó el carácter lisogénico de la cepa *Lb. helveticus* CNRZ 241. El efecto de la temperatura sobre la liberación espontánea de fagos por la cepa muestra que a 30 °C la concentración inicial de fagos libres del cultivo prácticamente no se modifica, sufriendo un incremento de aproximadamente un orden logarítmico a las 7 horas. A 37 °C y 42 °C las cinéticas de liberación de fagos resultaron



---

similares con valores máximos de  $3 \cdot 10^4$  UFP/ml alcanzados a las 6-7 horas de incubación, luego de lo cual, los títulos fágicos descendieron hasta alcanzar los valores de  $t=0$  a las 16 horas aproximadamente. Por otro lado, se demostró que este descenso se debe a una escasa resistencia de los fagos en medio ácido, perdiendo rápidamente su viabilidad.

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 mostraron ser más resistentes. 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 (Guglielmotti, 2003).

Según nuestro estudio no existió, una apreciable influencia de la concentración de Mitomicina C en la evolución de la tasa de liberación fágica de la cepa *Lb. helveticus* CNRZ 241. Los valores máximos de recuentos alcanzaron niveles de  $6,9 \cdot 10^5$  UFP/ml a las 2,5 horas, luego, de lo cual se observó una disminución de los mismos. La Mitomicina C produce un cierto retardo en el crecimiento de la cepa proporcional a la concentración del antibiótico ensayado. La inducción fágica por MC, bajo condiciones estándares, raramente excede valores de  $6 \cdot 10^8$  UFP/ml. Ciertas cepas suelen no ser susceptibles a la inducción bajo condiciones estandarizadas (Reyrolle y col., 1982). Estos autores informaron que la mayoría de las cepas de una colección de 113 cepas lácticas mesófilas clasificadas en base a su sensibilidad a los fagos virulentos fueron lisogénicas y sus fagos temperados producidos espontáneamente o luego de inducción como MC pertenecen al mismo grupo sensible que los fagos virulentos caracterizados por Chopin y col. (1976). Esta correlación entre fagos temperados y virulentos a través de sus espectros líticos confirma la hipótesis de Lawrence y col. (1976) y corrobora las similitudes morfológicas establecidas entre estos tipos de fagos.

- ◆ *Lactobacillus delbrueckii* es una de las especies de BAL (junto con *S. thermophilus*) usada en la producción de yogur y es un constituyente fundamental de los



---

cultivos iniciadores empleados en la elaboración de quesos de pasta cocida (Curry y col, 2003; Giraffa y col, 2004).

En este trabajo de Tesis se estudió la frecuencia de la lisogenia entre cepas de esta especie. Solo fue posible encontrar cepas sensibles para 6 sobrenadantes tratados con Mitomicina C, (un 37% del total de cepas testeadas). Todos los sobrenadantes, después del tratamiento a 90 °C, dieron señal negativa sobre las mismas cepas, demostrando así la existencia de partículas virales activas o sustancias termosensibles como por ejemplo las bacteriocinas. En solo 3 sobrenadantes tratados con Mitomicina C pudieron encontrarse fagos capaces de proliferar y lisar cepas indicadoras. Partículas virales activas pudieron ser aisladas de la cepa comercial *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1, las cuales fueron capaces de propagar sobre dos cepas hospedadoras, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 204 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 342. Según la cepa utilizada para propagarlos, los fagos aislados y purificados se denominaron Cb1/204 y Cb1/342.

El estudio de la lisogenia en BAL es muy importante por muchas razones. En un nivel práctico, las cepas lisogénicas son un reservorio de fagos líticos en plantas lecheras (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). La lisogenia está ampliamente difundida en lactococos y lactobacilos, y en muchos estudios se han demostrado altas frecuencias de cepas lisogénicas (Sechaud y col., 1988; Davidson y col., 1990; Sechaud y col., 1992; Carminati, 1997; Josephsen y Neve 1998). Aparentemente, la lisogenia es menos común en *S. thermophilus* desde que Carminati y Giraffa (1992) encontraron solo una cepa inducible por Mitomicina C de 45 cepas testeadas. En *Lb. helveticus*, las cepas inducibles están en el rango del 10% al 80% según Carminati y col. (1997). En el presente estudio la lisogenia ha sido solo confirmada para *Lb. delbrueckii*. Fueron encontradas cepas hospedadoras para un 19 % los sobrenadantes tratados con Mitomicina C (3 de 16). Un importante hecho fue que una de las inducibles era una cepa comercial. Aún si en lactobacilos existe un alto porcentaje de cepas que son inducibles, partículas fágicas completas capaces de propagarse en cepas huésped son menos frecuentes (Carminati y col., 1997).

Los fagos temperados Cb1/204 y Cb1/342, aislados en el presente estudio, mostraron cabezas prolatas con colas largas no contráctiles con estrías transversales y dimensiones



---

similares. Estos fagos se clasificaron como miembros de la familia *Siphoviridae* (morfotipo B1) (Matthews y col. 1982) o correspondientes al Grupo B de Bradley (Bradley, 1967). De acuerdo a su morfología, estos fagos pertenecen al grupo *c* (fagos de cabeza prolata), según la clasificación de fagos de *Lb. delbrueckii* (Sechaud y col., 1988).

Ambos fagos temperados (Cb1/204 y Cb1/342) presentan una cola mas larga que los aislados de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* JCL 1032 (Forsman ,1993) y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 0235 (Sechaud y col, 1988) y sus dimensiones fueron similares a las del fago temperado de cabeza prolata inducidos a partir de *Lb. acidophilus* y8 (Kilic y col, 1996).

Es importante destacar que nuestro estudio es el primero realizado para indagar la presencia de la lisogenia en la especie *Lb. delbrueckii*. Es asimismo muy relevante señalar que los fagos temperados aislados fueron inducidos a partir de una cepa comercial, hecho de gran significación práctica.

♦ Variaciones fenotípicas en bacterias lácticas se han observado desde hace mucho tiempo. Estas variaciones pueden tener su origen en respuesta a un nutriente limitante o a cambios en las condiciones de crecimiento de la cepa. Temperatura, pH, niveles de oxígeno y algunos otros componentes del medio de cultivo han demostrado inducir cambios en la morfología celular y de las colonias. En estos casos, la totalidad de la población bacteriana sufre variaciones y la morfología original reaparece cuando las condiciones de crecimiento son restituidas (Reinheimer y col, 1995).

En el género *Lactobacillus* se ha estudiado de manera escasa la heterogeneidad celular de cultivos en crecimiento bajo condiciones ambientales y nutricionales no limitantes. Algunas evidencias de células y colonias morfológicamente heterogéneas en *Lactobacillus* fueron publicadas (Klaenhammer 1981, Vescovo 1990). En nuestro trabajo fue posible aislar dos variantes morfológicas de colonias, a partir de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* Ab<sub>1</sub>. Estas morfologías coloniales, circular opaca (C) y rugosa transparentes (T), fueron similares a las encontradas para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB6 (Vescovo y col. 1990) y para *Lactobacillus acidophilus* RL8K (Klaenhammer y Kleeman 1981). Determinamos que la variante C fue dominante (85 % del total del recuento



---

celular). En cuanto a las características celulares, la variante C en agar mostró formas bacilares espiraladas mientras que la variante T poseía morfologías bacilares rectas.

Cuando la cepa de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> se enfrentó al fago YAB, demostró ser sensible (lisis en el 1° repique). Si bien esta lisis en caldo fue rápida y evidente, no resultó completa ya que fue posible constatar que en el cultivo queda un residuo celular que no lisa, (aproximadamente el 0,01 % de la población celular total). A partir de este residuo celular, solo el 0,001% de sus colonias constituyeron la fracción de la población celular confirmada como resistente. Es bien conocido que la frecuencia de mutantes fagorresistentes en poblaciones de bacterias lácticas es baja (Moineau, 1999). Valores similares fueron encontrados para *Lb. helveticus* CNRZ 328 (Reinheimer y col. 1993), en la cual la proporción de células fagorresistentes resultó del 0,003 % del total de la población. De cualquier manera, para *S. thermophilus* la tasa de variantes fagorresistentes informada por Binetti y col. (2007), fue de aproximadamente 10<sup>-6</sup> % como valor promedio de 12 cepas. Capra (2006) informó que el aislamiento de mutantes fagorresistentes reales y estables de 3 cepas de *Lactobacillus paracasei* no fue posible. De 38 mutantes presuntamente fagorresistentes aislados de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>, fue posible confirmar como tales solo 4 (de ambas variantes morfológicas). Carminati y col. (1993) informaron que aislaron a partir de 9 cepas *Lb. helveticus*, 32 mutantes realmente fagorresistentes, que constituyeron el 35 % de las variantes presuntamente fagorresistentes. En otro trabajo, para una cepa de *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1998) se reportó un porcentaje similar (37,5 %), recolectando 66 mutantes confirmados como fagorresistentes a partir de 176 presuntamente resistentes. Para *S. thermophilus*, Binetti y col., (2007) informaron un valor de 22,6% . No existen datos previos sobre la relación entre las variantes morfológicas y las fagorresistentes. En nuestro trabajo, fue posible demostrar que la variante C, la cual era mayoritaria en la población original (85 %), presentó un bajo porcentaje de variantes realmente fagorresistente (15 %), calculada considerando el total de los mutantes presuntamente fagorresistentes. Para la variante T, la cual fue encontrada en una baja proporción con respecto a la población original (15 %), el número de variantes fue de aproximadamente un 85 %. Se comprobó que



---

existió una relación inversa entre el porcentaje de ocurrencia de las variantes morfológicas y sus variantes fagorresistentes.

Los valores de EOP encontrados para nuestros mutantes fueron más bajos que el límite de detección ( $10^{-7}$ ), indicando esto un alto nivel de resistencia (Moineau, 1999). Similares resultados fueron reportados para *Lb. helveticus* (Reinheimer 1993, Carminati y Giraffa, 1992; Quiberoni, 1999), *S. thermophilus* (Binetti, 2007) y *Lb. delbrueckii* (Guglielmotti, 2006). La estabilidad de este fenotipo fue alto (hasta el 7<sup>mo</sup> repique) para los mutantes que presentaron interferencia en la adsorción, todos derivados de la variante T.

Los mecanismos de fagorresistencia detectados en nuestros mutantes fueron interferencia en la adsorción y mecanismos intracelulares. Los mutantes derivados de las variantes morfológicas T mostraron valores de adsorción (luego de 30 min) más bajos que el 15%, y para ellos el mecanismo excluyente de fagorresistencia fue la interferencia en la adsorción. Este mecanismo es en general, dominante para todas las especies de bacterias ácido lácticas (Quiberoni, 1999; Guglielmotti, 2006 y Binetti, 2007). Muchos de los mutantes bacterianos fagorresistentes deben su resistencia a la pérdida o modificación de sus receptores fágicos debidos a mutaciones en los correspondientes genes (Riipinen y col., 2007). Sin embargo, para la variante C, los valores de adsorción fueron altos y normales (93%), pero no hubo presencia de lisis en los consecutivos 3 repiques. Este hecho sugiere la existencia de un mecanismo intracelular o una combinación de éstos.

Durante los últimos años, el análisis por restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) ha sido usado exitosamente para diferenciar especie de lactobacilos (Drabie y col., 1996; Andrighetto y col.; Giraffa y col, 1998, Roy y col.; 2001). El corte del fragmento amplificado con la enzima de restricción *EcoRI* permite diferenciar distintas subespecies de *Lb. delbrueckii* (*delbrueckii*, *lactis* y *bulgaricus*) (Giraffa y col, 1998).-

En este estudio, tanto la cepa madre como sus mutantes morfológicas y fagorresistentes demostraron pertenecer a la subespecie *lactis*.

La comparación de los patrones RAPD usando los oligonucleótidos M13 y 1254 mostraron un coeficiente de similitud superior al 95% entre la cepa madre *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab1 y sus derivados (morfológicos y fagorresistentes). Este hecho es una confirmación de que los



---

clones aislados derivan ciertamente de la cepa en estudio y que no ha existido contaminación durante su obtención.

Se ha intentado numerosas veces el empleo de variantes espontáneas fagorresistentes como medio para controlar la infección fágica en elaboraciones queseras comerciales. Sin embargo estas suelen sufrir alteraciones en sus propiedades tecnológicas, tales como pérdida de la actividad proteolítica y, por ende, acidificante (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). Varios autores han reportado la inestabilidad de mutantes de estreptococos lácticos resistentes a fagos con respecto a su actividad acidificante, pero son escasos los datos bibliográficos disponibles acerca de la obtención de variantes con una actividad acidificante elevada a partir de lactobacilos termófilos (Carminati y col., 1993).

Con respecto a la performance industrial de los mutantes fagorresistentes obtenidos en esta Tesis, existió heterogeneidad entre ellos. Sólo uno (Ab<sub>1</sub> T(b<sub>2</sub>)) mostró propiedades fisicoquímicas similares a la cepa madre. Esta heterogeneidad fue también informada para *Lb. helveticus* (Carminati y col, 1993; Reinheimer y col, 1993; Quiberoni y col. 1999). Para la especie *S. thermophilus*, Binetti y col. (2007) informaron que los mutantes fagorresistentes aislados de 12 cepas comerciales presentaron características tecnológicas iguales e incluso mejores (niveles de acidificación, actividades acidificantes y proteolíticas) a los de la cepa madre. Guglielmotti y col. (2006) reportaron para *Lb. delbrueckii* el aislamiento de mutantes fagorresistentes con similares y diferentes propiedades tecnológicas respecto a sus cepas madres.

En el presente trabajo de tesis fue posible aislar una variante fagorresistente, ligada a la heterogeneidad morfológica de la cepa, sensible a fagos, y con buena aptitud tecnológica, lo que la constituye en una cepa de potencial alto valor comercial. Esta cepa podría incluirse en un programa de rotación sin ningún tipo de restricción legal.



**conclusiones**

---



---

A partir de de los resultados obtenidos en el presente trabajo puede concluirse:

- ◆ Las cepas salvajes de *Streptococcus thermophilus* estudiadas, en su mayoría, mostraron una elevada resistencia frente a los fagos autóctonos utilizados (mediante diversos mecanismos), convirtiéndose en cepas potencialmente útiles para la industria láctea.
- ◆ Asimismo, las cepas salvajes de *Lactococcus lactis* estudiadas, manifestaron alta resistencia fágica debida a la presencia de mecanismos intracelulares, muy efectivos.
- ◆ Respecto a la cepa lisógena *Lactobacillus helveticus* CNRZ 241, no se demostró una apreciable influencia de la concentración de Mitomicina C en la tasa de liberación fágica de la cepa. El descenso en los recuentos de fagos liberados luego de alcanzar el máximo valor se debe a la inactivación fágica por la acidez del medio.
- ◆ Investigando lisogenia en lactobacilos termófilos, de la cepa comercial *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1 fue posible inducir partículas virales activas, capaces de propagar sobre dos cepas hospedadoras (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 204 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 342). Los fagos temperados aislados (Cb1/204 y Cb1/342) se clasificaron como miembros de la familia *Siphoviridae* (morfotipo B1) y del Grupo B de Bradley, así como pertenecientes al grupo *c* (fagos de cabeza prolata), según Sechaud.
- ◆ A partir de la cepa comercial *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub> se pudo aislar 2 variantes morfológicas (C y T), que presentaron un perfil de fermentación de azúcares (galerías API) idéntico al de la cepa madre. En cuanto a la fagorresistencia, estas variantes morfológicas resultaron sensibles al fago YAB, con valores de EOP cercanos a 1 y con altas tasas de adsorción fágica (95%) al igual que la cepa madre. Sin embargo, la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Ab<sub>1</sub>, posee un residuo celular que no lisa, a partir del cual fue posible revelar la existencia de variantes C y T con una muy alta fagorresistencia. El mecanismo de fago resistencia en las variantes T fue la interferencia de la adsorción. En cambio, la variante C obtenida demostró un mecanismo de resistencia fágica intracelular (tipo restricción /modificación) no muy efectivo. En cuanto a los estudios realizados por PCR-ARDRA sobre la cepa madre, sus variantes morfológicas y sus variantes fagorresistentes, éstos confirmaron la identidad de las mismas como *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*.

El presente estudio demuestra que cepas salvajes de *S. thermophilus* y *Lactococcus* poseen una elevada fagorresistencia, lo cual las vuelve interesantes para fines industriales.



---

Para lactobacilos termófilos debe prestarse atención a la existencia de cepas lisógenas, riesgosas para su uso industrial. Sin embargo, algunas cepas ofrecen una heterogeneidad celular a partir de la cual pueden obtenerse variantes espontáneas con alta fagorresistencia y aceptable performance tecnológica.



**bibliografía**

---



- 
1. Ackermann, H. W. (1999). Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. *Advances in Virus Research*. 51, 135-201.-
  2. Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology* 154, 245-251.-
  3. Ackermann, H.; W. and DuBow, M. S.(1987). *Viruses of prokaryotes*.Vol.II. Natural group of bacteriophages. CRC. Press, Boca Raton, FL.-
  4. Akopyanz, N.; Bukanov, N. O.; Westblom, T. U.; Kresovich, S. and Berg, D. E. (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 20, 5137-5142.-
  5. Andrighetto, C.; De Dea, P.; Lombardi, A.; Neviani, E.; Rossetti, L. y Giraffa, G. (1998). Molecular identification and cluster análisis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Research in Microbiology*, 149(9):631-643.-
  6. Anzaldo, A. A. (1995). En la frontera de la vida: los virus. Fondo de Cultura Económica, S. A. de CV. Cap. 3.-
  7. Auclair, J. and Accolas, J. P. (1983). Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry (Review). *Antonie Van Leeuwenhoek*. 49(3):313-26.-
  8. Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. 2<sup>nd</sup> Ed. Salminen, S. and Wright, A. V. (Ed.) Cap. 1, 1-22.-
  9. Bickle, T.A. y Krüger, D. H. (1993). Biology of DNA restriction. *Microbiological Reviews*, 57(2) 434-450.-
  10. Binetti, A. G.; Suárez, V. B.; Taillez, J. A. y Reinheinmer, J. A. (2007). Characterization of spontaneous phage-resistant variants of *Streptococcus thermophilus* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and identification of phage-resistance mechanisms. *International Dairy Journal* 17 , 1115-1122.-
  11. Binetti, A. G. (2001). Bacteriófagos autóctonos de *S. thermophilus*: aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fagorresistentes. Tesis para obtener el grado de Doctor en Química. Universidad Nacional del Litoral.-



- 
12. Binetti, A. G.; Bailo, N. B. and Reinheimer, J. A. (2007). Spontaneous phage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*: Isolation and technological characteristics. *International Dairy Journal* 17, 343-349.-
  13. Binetti, A.; Quiberoni, A. and Reinheimer, J. A. (2002). Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Research International* 35, 73-83.-
  14. Bolondi, A.; Gagging, O. and Monesiglio, J. (1995). *Microscopía electrónica: técnicas generales* ed. Unidad de Microscopia Electrónica y Bioquímica Aplicada del Centro de Investigaciones. Ciencias Veterinarias-INTA- Castelar. Argentina.-
  15. Botazzi, V. (1981). Le caratteristiche della coltura naturale impiegata nella produzione del formaggio Grana. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* 32, 418-430.-
  16. Boucher, I. and Moineau, S. (2001). Phages of *Lactococcus lactis*: an ecological and economical equilibrium. *Recent Research and Developmental Virology* 3, 243-256.-
  17. Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews* 31(4), 230-314.-
  18. Callegari, M. L. (1999). Apuntes del Curso de Postgrado "Fagorresistencia en Bacterias Lácticas". Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.-
  19. Capra, M.L. (2006). Bacteriófagos de *Lactobacillus casei paracasei*. Caracterización y estudio de la fagorresistencia. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.-
  20. Carminati, D.; Zennaro, R.; Neviani, E. and Giraffa, G. (1993). Selezione e caratteristiche di 11 mutanti fago-resistenti di *Lactobacillus helveticus*. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* 44 (1), 12 33-48.-
  21. Carminati, D. and Giraffa, G. (1992). Evidence and characterization of temperate bacteriophage in *S. salivarius* subsp. *thermophilus* St. 18. *Journal of General Microbiology* 59, 71-79.-



- 
22. Carminati, D.; Mazzucotelli, G.; Giraffa, G. and Neviani, E. (1997). Incidence of inducible bacteriophage in *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey starter cultures. *Journal of Dairy Science* 80, 1505-1511.-
23. Carminati, D.; Zennaro, R.; Neviani, E.; Giraffa, G. (1993). Selezione e caratteristiche di mutanti fagoresistenti de *Lb. helveticus*. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* 44 (1).-
24. Chopin, M. C.; Chopin, A. y Roux, C. (1976). Definition of Bacteriophage Groups according to their lytic action on mesophilic lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* 32 (6), 741-746.-
25. Chr. Hansen. (1998). Bacteriófagos. Un problema latente en la industria quesera. Cuadernillo 13.-
26. Chung, D. K.; Chung, S. K. and Batt, C. A. (1992). Antisense RNA directed against the major capsid protein of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* bacteriophage 4-1 confers partial resistance to the host. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 79-83.-
27. Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H. and Catignain, G. L. (1983). Spectrophometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66, 1219-1227.-
28. Coetzee, J. N. and de Klerk, H. C. (1962). Lysogeny in the genus *Lactobacillus*. *Nature* 190-195.-
29. Coffey, A. and Ross, P.R. (2002). Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: Molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 303-321.-
30. Curry, B. and Crow, V. (2003). *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. In *Encyclopedia of dairy science* Ed. Roginski, H.; Fuquay, J. and Fox, P. Cornwall, UK: Academic Press Elsevier Science 1479-1511.-
31. Davidson, B.; Powell, I. B. and Hillier, A. J. (1990). Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87, 79-90.-
32. de los Reyes Gavilán, C.; Limsowtin, G.; Séchaud, L.; Veaux, H. and Accolas J. P. (1990). Evidence for a plasmid linked restriction-modification system in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (11), 3412-3419.-



- 
33. Deibel, R. H. ; Mancourt, D. C. F.; Niven, J. R. and Schweigert, B. S. (1956). Filament formation by *Lactobacillus leichmannii* when desoxyribosides replace vitamin B<sub>12</sub> in the growth medium. *Journal of Bacteriology* 71, 255-256.-
34. Deveau, H.; Larbie, S. J.; Chopin, M. C. and Moneau, S. (2006). Biodiversity and classification of Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (6), 4338-4346.-
35. Dinsmore, P. K and Klaenhammer, T. R. (1995). Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Review Molecular Biotechnology* 4, 297-313.-
36. Durmaz, E. and Klaenhammer, T. R (1995) A starter culture rotation strategy incorporating paired restriction/modification and abortive infection bacteriophage defenses in a single *Lactococcus lactis* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4), 1266-1273.
37. Everson, T.C. (1991). Control of phage in the dairy plant. In: *Bulletin. FIL-IDF N° 236*. Cap. 3.-
38. Forde, A. and Fitzgerald, F. G. (1999). Bacteriophage defense systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 89-113.-
39. Forsman, P. (1993). Characterization of a prolate-headed bacteriophage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*, and its DNA homology with isometric-headed phages. *Archives of Virology*. 132, 321-330.-
40. Frank, J. F. and Hassan, A. N. (1998). Starter cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology*. Marth, E. H. and Steele, J. L. (Ed.). Cap 6, 149-160.-
41. Frank, J. T. and Hassan, A. N. (1998). Starter Cultures and Their Use. In: *Applied Dairy Microbiology*. Marth, E. H. and Steele, J.L. (Ed). Cap 6, 131-137.-
42. Giraffa, G.; De Vecchi, P. and Rossetti (1998). Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and *lactis* dairy isoates by amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Applied Microbiology* 85 (5): 9, 18-24.-
43. Giraffa, G. and Rosetti, L. (2004). Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters* 237, 133-138.-



- 
44. Giraffa, G.; Rossetti, L. and Neviani, E. (2000). An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 42, 175-184.-
45. Gopal, P. K. and Crow, V. L. (1993). Characterization of loosely associated material from the cell surface of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8 and its phage resistant variant strains 398. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3177-3182.-
46. Guglielmotti, D. (2003). Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles. Tesis para obtener el título de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nacional del Litoral.-
47. Guglielmotti, D. (2006). Caracterización molecular de fagos argentinos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y obtención de mutantes fagorresistentes para aplicaciones industriales. Tesis para obtener el título de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.-
48. Guglielmotti, D. M.; Reinheimer, J. A.; Binetti, A.; Giraffa, G.; Carminati, D. and Quiberoni, A. (2006). Characterization of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* commercial strains. *International Journal of Food Microbiology* 111, 126-133.-
49. Heap, H. A. and Xanst, J. P. (2003). Bacteriophage in dairy industry. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Roginski, H. ; Fuquay, J. and Fox, P. F. (Ed.). 136-141.-
50. Hill, C.; Miller, L. A.; Klaenhammer, T. R. (1990). Cloning expression and sequence determination of a bacteriophage fragment encoding bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 192 ,6419-6426.-
51. Hill, C. (1993). Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 87-108.-
52. Holden, J. T. and Holman, J. (1957). Abnormal cellular morphology associated with a vitamin B<sub>6</sub> deficiency in *Lactobacillus arabinosus*. *Journal of Bacteriology* 73, 592-593.-
53. Huey, B. and Hall, J. (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *Bacteriology* 171, 2528-2532.-



- 
54. Jarvis, A. W. (1989). Bacteriophages of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 72, 3406-3428. -
55. Jeener and Jeener (1952). *J. Expl. Cell Research*, 3, 675.-
56. Josephsen, J. and Neve, H. (1998). Bacteriophages and Lactic Acid Bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Funtional Aspects*, 2<sup>nd</sup> ed. Salminen, S. and Wright, A.V. (eds.). Cap. 14, 385-418. -
57. Josephsen, J. y Neve, H. (2004). Bacteriophage and antiphage mechanisms of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Funtional Aspects*, 2<sup>nd</sup> ed. Salminen, S. and Wright, A.V. (eds.).
58. Kilic, A.; Pavlova, S. ; Wen Ge Ma and Li Tao (1996). Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt. *Appllied and Environmental Microbiology* 62 (6), 2111-2116.-
59. Klaenhammer, T. R. and Kleeman, E. G. (1981). Growth characteristics, bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Enviromental Microbiology* 41 (6), 1461-1467.-
60. Klaenhammer, T. R. and Fitzgerald, G. F. (1994). Bacteriophages and bacteriophage resistance. In: *Genetics and Biotechnology of Lactic Adic Bacteria*. Gasson, M. J. and de Vos, W. M. (Ed). Cap.3, 106-158.-
61. Klaenhammer, T. R. (1984). Interactions of bacteriophages with streptococci. *Advances in Applied Microbiology* 30, 1-29.-
62. Krieg, N. R. and Holt, J. G. (ed). (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.-
63. Labrie, S. J. and Moineau, S. (2007). Abortive infection mechanisms and prophage sequences significantly influence the genetic makeup of emerging lytic lactococcal phages. *Journal of Bacteriology* 189 (4), 1482-1487.-
64. Larbi, D.; Decaris, B. and Simonet, J. M. (1992). Different bacteriophage resistance mechanisms in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Journal of Dairy Research* 59, 349-357.-



- 
65. Lawrence, R. C.; Thomas, T. D. and Terzaghi, B. E. (1976). Reviews of the progress of Dairy Science: Cheese starters. *Journal of Dairy Reserch.* 43, 141-193.-
66. Limsowtin, G. K. Y.; Broome, M. C. and Powell, I. B. (2003). Lactic acid bacteria. Taxonomy. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences.* Roginski, H. ; Fuquay, J. and Fox, P. F. (Ed.), 1470-1478.-
67. Limsowtin, G. K. Y.; Heap, H. A. and Lawrence, R. C. (1978). Heterogeneity among strains of lactic streptococci. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 13,1-8.-
68. Frank, J.F. and Hassan, A. N (1998). *Applied Dairy Microbiology.* Cap. 6. Starters cultures and their use (marth, e. H. And Steels, J. L) Marcel Deleter Inc. New York, USA, 131-172.
69. Matthews, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirolgy* 17, 1-200.-
70. Moineau, S. (1999). Applications of phage resistente in lactic cid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* 76, 377-382.-
71. Moineau, S. and Lévesque, C. (2005). Control of bacteriophages in industrial fermentations. In *Bacteriophages: Biology and Applications.* Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (Eds.) 285-296.
72. Murray, N. (2000). Type I Restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (2), 412-343.-
73. Neve, H. (1996). Bacteriophages. In: *Dairy Starter Cultures.* Cogan and T. M. Accolas, J. M. (Ed.) VCH Publisher Inc. Cap. 6. 157-190.-
74. Neviani, E. D. Carminati, and G. Giraffa.(1992). Selection of some bacteriophage and lysozyme-resistant variants of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. *Journal of Dairy Science* 75, 905-913.-
75. Peitersen, N.; Sellars, R. L. and Cogan, T. M. (1991). Starter Systems. In: *Bulletin FIL-IDF* N° 263. Cap.2 .-
76. Quiberoni, A. L. (1997). Interacción de bacterias lácticas termófilas con bacteriófagos específicos. Tesis para obtener el título de Doctor en Química. Universidad Nacional del Litoral.-



- 
77. Quiberoni, A.; Auad, L.; Binetti, A. G.; Suárez, V. B.; Reinheimer, J. A. and Raya, R. R. (2003). Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yogurt industrial plant. *Food Microbiology* 20, 461-469.-
78. Quiberoni, A.; Reinheimer, J. A. and Suárez, V. B. (1998). Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage-resistant mutants in hard cheese production. *International Dairy Journal* 8, 941-949 .-
79. Quiberoni, A.; Reinheimer, J. A. and Tailliez, P. (1999). Characterization of *Lactobacillus helveticus* phage resistant mutants by RAPD fingerprints and phenotypic parameters. *Food Research Internacional* 31 (8), 537-543.-
80. Randall, K. H. and Jobling, M. G. (1984). Genetics. In: *Baron's Medical Microbiology* (Baron, S. et al, eds.), 4th ed., Univ. of Texas Medical Branch. Cap. 5.-
81. Reinheimer, J. A. ; Binetti, A. G.; Quiberoni, A.; Bailo, N. B.; Rubiolo, A. C. and Giraffa, G. (1997). Natural milks cultures for the production of Argentinean Cheeses. *Journal of Food Protection* 60, 59-63.-
82. Reinheimer, J. A.; Morelli, L.; Bottazzi, V. and Suárez, V. (1995). Phenotypic variability among cells of *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *International Dairy Journal* 5, 97-103 .-
83. Reinheimer, J. A.; Suárez, V. B.; Bailo, N. B. and Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection* 58 (7), 796-799.-
84. Reinheimer, J. A.; Morelli, L.; Callegari, M. L.; Botazzi, V. (1993). Phage resistance in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 328. *Microbiologie Aliments Nutrition* 11 ,235-240.-
85. Reyrolle, J.; Chopin, M. C.; Letellier, F. and Novel, G. (1982). Lysogenic strains of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (2), 349-356.-
86. Riipinen, K. A.; Räsänen, L. and Alatossava, T. (2007). Integration of group c phage JCL 1032 of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* and complex phage resistance of the host. *Journal of Applied Microbiology* 103 (6), 2465-75.-



- 
87. Roy, D.; Sirios, S. and Vincent, D. (2001). Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiology* 42, 282-289.-
88. Séchaud, L. ; Rosseau, M. ; Fayard, B. ; Callegari, M. L. ; Quénéé, P. and Accolas, J. P. (1992). Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: morphology and host range. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (3), 1011-1018.-
89. Sechaud, L.; Cluzel, P.J.; Rousseau, M.; Baumgartner, A. and Accolas, J. P.(1988). Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie* 70, 401-410.-
90. Sechaud, L.; Rousseau, M.; Fayard, B.; Callegari, M. L.; Quénéé, P. and Accolas, J-P.(1992). Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: morphology and host range. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (3), 1011-1018.-
91. Sleytr, V. B.; Messner, P.; Pum D. and Sara, M. (1993). Crystalline bacterial surface layers general principles and applications potential. *Journal of Applied Bacteriology* Supplied 54, 215-325 .-
92. Solomon, E. P. ; Ville, C. A. and Davis, P.W. (1987). *Biología*. Editorial Interamericana. Cap. 18, 408-422.-
93. Sozzi, T.; Poulin, J. M. and Maret, R. (1978). Effect of incubation temperature on the development of lactic acid bacteria and their phages. *Journal of Dairy Science* 45, 259-265.-
94. Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L. and Painter, P. R. (1993). *Il mondo dei microorganismi*, 2<sup>nd</sup> Ed. 241-242.-
95. Steenson, L. R. and Khaenhammer, T. R. (1986). Plasmid heterogeneity in *Streptococcus cremoris* M12R. Effects on Proteolytic activity and host dependent phage replication. *Journal of Dairy Science* 69, 2227-2236.-
96. Stiefel, I. J. (2000). Caracterización del proceso de adsorción de fagos a bacterias lácticas termófilas. Tesis para obtener el título de Magíster en Ciencia de Alimentos. Universidad Nacional del Litoral.-



- 
97. Suárez, V. B.; Quiberoni, A.; Binetti, A. G. y Reinheimer, J. A. (2002). Infecciones fágicas en la industria láctea argentina. Incidencia e implicancias. *Revista Argentina de Lactología* 21,57-73.-
98. Suárez, V.; Zago, M.; Giraffa, G.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2007). Evidencia de un sistema de restricción/modificación en la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 204, hospedadora de un nuevo fago de cabeza prolata. XI congreso CYTAL, 2º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Buenos Aires, Argentina, 12-14/09/07.-
99. Suárez, V.; Moineau, S.; Reinheimer, J. and Quiberoni, A. (2008). Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies. *Journal of Applied Microbiology* 104, 371-379.-
100. Suárez, V.; Zago, M.; Quiberoni, A.; Carminati, D.; Giraffa, G. and Reinheimer, J. (2008). Lysogeny in *Lactobacillus delbrueckii* strains and characterization of two new temperate prolate-headed bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology* (105, 1402-1411).-
101. Suárez, V.B.; Quiberoni, A.; Binetti, A. G. and Reinheimer, J.A. (2002). Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from argentinian dairy industries. *Journal of Food Protection* 65 (10), 1597-1604.-
102. Svensson, U. and Christiansson, A. (1991). Methods for phage monitoring. *Bulletin of the FIL*.Nº 263.Cap.4, 29-39.-
103. Valyasevi, R.; Sandine, W. E. and Geller, B. L. (1990). The bacteria phage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH in the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1882-1889.-
104. Valyasevi, R.; Sandine, W. E. and Geller, B. L. (1993). A membrane protein is required for bacteriophage c 2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* C2. *Journal of Bacteriology* 173 (19), 6095-6100.-
105. Vauterin, L. and Vauterin, P. (1992). Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology* 1, 37-41.-



- 
106. Ventura, M.; Callegari, M. L. and Morelli, L. (1999). Surface layer variations affecting phage adsorption on seven *Lactobacillus helveticus* strains. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 49, 45-53.-
107. Vescovo, M. ; Bottazzi, V. and Prestini, P. A. (1990). Different phage sensitivity in morphological variants of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB6. *Annals of Microbiology* 40, 197-203.-
108. Viscardi, M; Capparelli, & Iannelli, D. (2003a). Rapid selection of phage-resistant mutants in *S. thermophilus* by immunoselection and cell sorting. *International Journal of Food Microbiology* 89, 223-231.-
109. Viscardi, M; Capparelli, R; Di Matteo ,R.; Carminati, D.; Giraffa, G. & Iannelli, D. (2003b). Selection of bacteriophage resistant mutants of *S. thermophilus*. *Journal of Microbiological Methods* 55, 109-119.-
110. Watanabe, K,; Ishibashi, K.; Nakashima and Sakurai, T. (1986). A phage resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *Journal of General Virology* 65, 981-986.-
111. Zago, M.; Suárez, V.; Reinheinmer, J. A. ; Carminati, D. and Giraffa, G. (2007). Spread and variability of the integrase gene in *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* strains and phages isolated from whey starter cultures. *Journal of Applied Microbiology* 102, 344-351.-



**anexo**

---



---

ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS. FORMULACIONES.

---

1. Medios de cultivo y reactivos

1.1. Medios Líquidos

CALDO ELLIKER (Biokar, France)

Composición	(g/l)
❖ Triptona	20.0
❖ Extracto de levadura	5.0
❖ Gelatina	2.5
❖ Lactosa	5.0
❖ Sacarosa	5.0
❖ Glucosa	5.0
❖ Acetato de sodio	1.5
❖ Cloruro de sodio	4.0
❖ Ac. Ascórbico	0.5
❖ Agua destilada	1000 ml

Autoclave a 121°C durante 15 min.

pH: 6.8

CALDO M17 (Biokar, France)

Composición	(g/l)
❖ Triptona	2.5
❖ Peptona pépsinica de soja	2.5
❖ Peptona papaínica de soja	5.0
❖ Extracto de levadura	2.5
❖ Extracto de carne	5.0
❖ Glicerofosfato de sodio	19.0
❖ Sulfato de magnesio heptahidratado	0.25
❖ Ac. Ascórbico	0.5



---

❖ Lactosa 10%	5ml
❖ Agua destilada	1000 ml

Autoclave a 121°C durante 15 min.

pH: 7

#### CALDO MRS (Biokar, France)

Composición	(g/l)
❖ Tripteína	10.0
❖ Extracto de levadura	5.0
❖ Extracto de carne	10.0
❖ Glucosa	20.0
❖ Fosfato de 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 ml
❖ Agua destilada	1000 ml

Autoclave a 121°C durante 15 min.

pH: 6,5 ± 0,2

#### Leche descremada reconstituida (LDR)

Leche descremada en polvo reconstituida, al 10% (p/v) en agua destilada. Autoclave a 115°C durante 30 min.



---

## 1.2. Medios Sólidos

### AGAR MRS (Biokar, France)

Composición	(g/l)
❖ Tripteína	10.0
❖ Extracto de levadura	5.0
❖ Extracto de carne	10.0
❖ Glucosa	20.0
❖ Fosfato de 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 ml
❖ Agar	12 g
❖ Agua destilada	1000 ml

Autoclave a 121°C durante 15 min.

### MRS soft-agar (MRS agar blando)

Caldo MRS adicionado de 0,6 g/l de agar bacteriológico. Autoclave a 121°C durante 15 min

### AGAR 1006: ALLISONELLA MEDIUM

Composición	(g-mg/l)
❖ Potasio fosfato dibásico	292.0 mg
❖ Potasio fosfato monobásico	292.0 mg
❖ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	480.0 mg
❖ Cloruro de sodio	480.0 mg
❖ Sulfato de magnesio heptahidratado	100.0 mg
❖ Cloruro de calcio bihidratado	64.0 mg
❖ Tripteína	1.0 mg



---

❖ Extracto de levadura	4.0 mg
❖ Resazurin	1.0 mg
❖ Agar	2.8 g
❖ Tween 80	3.1 ml
❖ Bicarbonato de calcio	4.0 g
❖ Cisteina-HCl xH <sub>2</sub> O	0.5 g
❖ Agar	14g
❖ Agua destilada	1000 ml

Autoclave a 121°C durante 15 min.

pH= 6.0

Disolver los ingredientes (excepto el bicarbonato, Tween y la cistina), hervir el medio durante 3 minutos, llevar a temperatura ambiente y agregar el bicarbonato de sodio, Tween y la cistina.

#### AGAR LAPTg

Composición	(g/l)
❖ Tripteína	10 g
❖ Peptona de carne	15 g
❖ Extracto de levadura	10 g
❖ Glucosa	10 g
❖ Agar	2.8 g
❖ Tween 80	1 ml
❖ Agar	15 g
❖ Agua destilada	1000 ml

Autoclave a 121°C durante 15 min.

pH= 6.6



---

### TSA (Tryptone Soy Agar)

Composición	(g/l)
❖ Tripteína	15 g
❖ Peptona papaínica de soja	5 g
❖ ClNa	5 g
❖ Agar	15 g
❖ Agua destilada	1000 ml

Autoclave a 121°C durante 15 min.

pH: 7.3 ± 0.2



---

### 1.3. Reactivos y buffers utilizados durante la extracción del ADN total

#### Buffer TE<sub>0,1</sub> (pH 8)

Se obtuvo mezclando una solución de Tris-HCl (10 mM) y de EDTA (10<sup>-4</sup> M).

#### Lisozima 50 mg/ml (Sigma Aldrich, Milán, Italia).

Se preparó a partir de una solución madre más concentrada. Se almacenó a -20°C.

#### Mezcla de lisis:

- Buffer TE<sub>0,1</sub> pH 8
- DTT (ditiotreitól) 1 M
- EDTA 0,25 M
- SDS 10% (p/v)
- Proteinasa K 20 mg/ml

#### Solución de Chelex 5% (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)

Se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mantuvo a 4°C hasta el momento de su uso.

#### Geles de Agarosa 1,5% (p/v) (Celbio spa, Milán, Italia)

Se pesó la cantidad adecuada y se disolvió en agua destilada. Luego se calentó, hasta que se fundió adecuadamente, y se usó en el momento.

### 1.4. Soluciones utilizadas en la caracterización tecnológica de los mutantes fagorresistentes

#### 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 calculó el factor de corrección mediante titulación de la base con biftalato de potasio.



---

#### Solución TCA 0,75 N (ácido tricloroacético) (Cicarelli, Argentina)

Se preparó a partir de una solución más concentrada de TCA (100%).

#### OPA (o-ftaldehído) (Sigma-Aldrich, Alemania), PM 134,1

Se preparó en el momento de su uso, ya que no puede almacenarse. Se pesaron 40 mg y se disolvieron en 1 ml de metanol. Una vez disuelto, se adicionó al resto de reactivos utilizados para la preparación del reactivo para OPA Test.

#### Solución para OPA Test

Se mezclaron los siguientes componentes:

Tetraborato de sodio 100 mM	25 ml
SDS 20% (p/p)	2,5 ml
OPA disuelto en 1 ml de metanol	40 mg
β-mercaptoetanol	0,1 ml

Se enrasó a 50 ml con agua bidestilada. Se utilizó en el momento, no pudiendo almacenarse.