



**Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**

Tesis doctoral

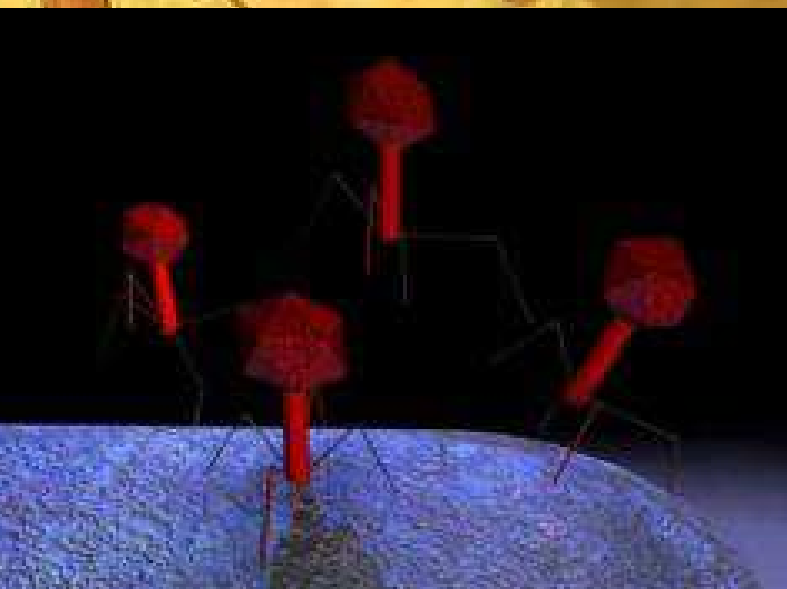
**Infecciones fágicas en *Lactobacillus plantarum*.
Caracterización e implicancias industriales**

Ing. Mariángeles Briggiler Marcó

Director: Dra. Andrea Quiberoni

Co-director: Dr. Jorge Reinheimer

Año 2012



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado académico de
Doctor en Ciencias Biológicas

**Infecciones fágicas en *Lactobacillus plantarum*.
Caracterización e implicancias industriales.**

Ing. Mariángeles Briggiler Marcó

Director: Dra. Andrea Quiberoni

Co-Director: Dr. Jorge Reinheimer

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

2012

**Miembros del Jurado designados para
actuar en la presente Tesis Doctoral:**

Titulares:

- ❖ **Dra. Analía Graciela Abraham**
Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)
Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata
- ❖ **Dra. Fernanda Beatriz Mozzi**
Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)
- ❖ **Dra. María Cristina Lurá**
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral

Suplente:

- ❖ **Dr. Carlos Roberto Carrara**
Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA)
Facultad de Ingeniería Química - Universidad Nacional del Litoral
-

No sé qué imagen tiene de mí el mundo, pero a mí me parece que he sido solamente un muchacho jugando a la orilla del mar, que se entretuvo encontrando aquí y allá una piedra más brillante o un caracol más hermoso, mientras que el gran océano de la verdad permanecía inexplorado frente a mí...

Sir Isaac Newton (1642-1727)

A mi familia....

Deseo expresar mi profundo agradecimiento....

❖ A la Universidad Nacional del Litoral por haberme dado la formación necesaria para poder llevar a cabo este trabajo.

❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por el otorgamiento de las becas y el financiamiento de los proyectos que permitieron la realización de mis estudios doctorales. También a la American Society for Microbiology (ASM) por el sustento monetario durante mi estadía en Canadá.

❖ A los miembros del Jurado, por el interés y tiempo dedicados a la lectura de este trabajo.

❖ Al personal de la oficina de posgrado de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, especialmente a Adriana y Gachi, por estar siempre dispuestas a responder mis consultas.

❖ A la Dra. Andrea Quiberoni, mi directora de tesis, por acompañarme incansablemente en este camino, teniéndome infinita paciencia y brindándome sus conocimientos de manera clara y sencilla. Por cuidar siempre de aquellos importantes detalles que se escaparon de mis manos. Por confiar en mí, por entenderme, por estar siempre dispuesta a escucharme. Por brindarme el estímulo y apoyo necesarios para emprender el viaje hacia Canadá.

❖ Al Dr. Jorge Reinheimer, mi co-director, por haberme permitido formar parte de este excelente grupo de trabajo. Por su constante predisposición y por transmitir con humildad sus conocimientos.

❖ Al Dr. Sylvain Moineau, por permitirme realizar una pasantía de especialización en su laboratorio. Por su calidad profesional y fundamentalmente humana. A todo su grupo de trabajo, por recibirme con mucha amabilidad, por ayudarme a manejarme tanto dentro como fuera del laboratorio, por la organización de actividades para hacer más amena mi estadía en el exterior. En especial a Josiane, por su incansable y enorme ayuda, por su paciencia. A Denise, por la obtención de las micrografías electrónicas. A Alfonso, por la ayuda brindada en todo momento, desde el primer día.

❖ Al Dr. Orlando Alfano, Antonio Negro y Gustavo Imoberdorf. Por aceptar llevar a cabo en conjunto los estudios de fotocátalisis. Por el valioso aporte para la realización de esta tesis y la constante buena predisposición.

❖ A todos mis compañeros del INLAIN, con quienes compartí estos años en un ambiente de trabajo cálido y amistoso. Gracias por compartir sus conocimientos a través de la enseñanza del manejo de algún equipo, puesta a punto de alguna técnica así como también por el préstamo de material. En especial a Dani, Luján y Diego por brindarme su desinteresada colaboración para la realización de este trabajo. A Aye, Vero, Anita, Leila, Claudia, Patri, Flor, Guille, Facu y Mario por la buena onda de todos los días, los mates y por todo lo compartido también fuera del laboratorio.

❖ A mi familia, por acompañarme en cada etapa de mi vida. En especial a mis padres, porque sin ellos no sería quien soy ni estaría donde estoy. Por la educación, los valores inculcados, los buenos ejemplos. A mi abuela quien estuvo siempre atenta a la fecha de mis exámenes y me acompañó con sus oraciones.

❖ A mis amigos....A los de Suardi, por todo lo vivido durante tantos años, por contar siempre con ellos a pesar de la distancia....A los que conocí durante mi paso por la FIQ, por la hermosa amistad que forjamos en medio de largas horas de estudio, la cual seguimos celebrando a pesar de la distancia y ocupaciones de cada uno. A aquellos que conocí en el INLAIN, por ser una de las razones por las que vale la pena ir a trabajar todos los días. Por la buena onda, por respetar mis silencios (algunas veces muy prolongados), y por tantos momentos agradables compartidos, dentro y fuera del laboratorio.

❖ A mi gran amiga Mariel, por nuestras largas horas de charlas, sus consejos, su apoyo, por escuchar sin juzgar... Por honrarme con su valiosa amistad.

❖ A la vida, por ser tan generosa conmigo!

A todos....GRACIAS TOTALES!

Manqui

Los resultados de esta Tesis Doctoral fueron difundidos a través de los siguientes trabajos científicos:

- Thermal, chemical and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. (2009). Briggiler Marcó, M.; De Antoni, G.L.; Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A. *Journal of Food Protection*, 72(5): 1012-1019.
- *Lactobacillus plantarum* bacteriophages isolated from kefir grains: Phenotypic and molecular characterization. (2010). De Antoni, G.; Zago, M.; Vasek, O.; Giraffa, G.; Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J.; Suárez, V. *Journal of Dairy Research*, 77(1): 7-12.
- Phage adsorption to *Lactobacillus plantarum*: influence of physiological and environmental factors. (2010). Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 270-275.
- Performance of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus plantarum* in fermented milk manufacture. (2011). Briggiler Marcó, M.; Mercanti, D.J.; Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A. *International Dairy Journal*, 21: 857-862.
- Evaluation of the photocatalytic inactivation efficiency of dairy bacteriophages. (2011). Briggiler Marcó, M.; Quiberoni, A.; Negro, A.C; Reinheimer, J.A.; Alfano, O.M. *Chemical Engineering Journal*, 172: 987-993.
- Genome sequencing of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. Briggiler Marcó, M.; Garneau, J.; Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A.; Moineau, S. (en preparación, 2012).

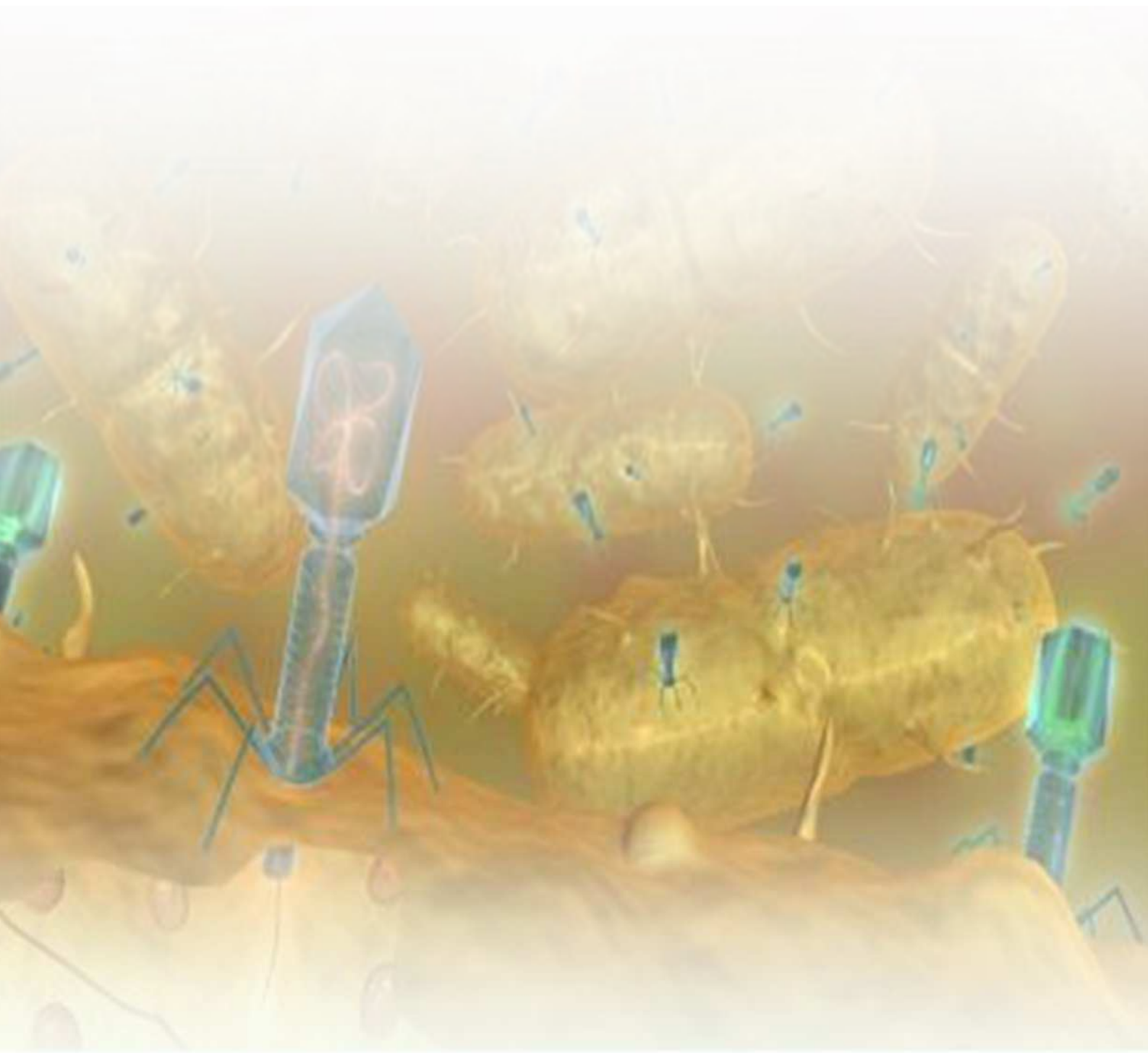
Capítulos en libros:

- Characterization of phage receptors in Lactic Acid Bacteria. Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J.; Quiberoni, A. En: *Food Quality: Control, Analysis and Consumer Concerns*, Daniel A. Medina y Amanda N. Laine (Editores), Nova Science Publishers, Inc. (en prensa, 2012). ISBN: 978-1-61122-917-2.
 - Infective cycle of dairy bacteriophages. Guglielmotti, D.; Mercanti, D.; Briggiler Marcó, M. En: *Bacteriophages in Dairy Processing*, Andrea Quiberoni y Jorge Reinheimer (Editores), Nova Science Publishers, Inc. (en prensa, 2012). ISBN: 978-1-61324-517-0.
-

Congresos:

- XIII Jornadas Argentinas de Microbiología (Rosario, 2008). Infecciones fágicas en *Lactobacillus plantarum*: estrategias clásicas y novedosas para disminuir su incidencia. Briggiler Marcó, M.; De Antoni, G.; Imoberdorf, G.; Irazoqui, H.; Alfano, O.; Quiberoni, A.; Reinheimer, J.
 - III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (Córdoba, 2009). Influencia de factores ambientales y fisiológicos sobre la adsorción fágica a *Lactobacillus plantarum*. Briggiler Marcó, M.; Guglielmotti, D.; Reinheimer, J.; Quiberoni, A.
 - III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. (Córdoba, 2009). Aislamiento y caracterización preliminar de los primeros bacteriofagos de *Lactobacillus plantarum* aislados de kefir. Suárez, V., De Antoni, G.; Zago, M.; Vasek, O.; Briggiler Marcó, M.; Giraffa, G.; Carminati, D.; Reinheimer, J.
 - III Simposio Internacional de Bacterias Lácticas, II Encuentro de la Red Argentina de Bacterias Lácticas (Red-BAL) (San Miguel de Tucumán, 2009). Phage adsorption and characterization of phage receptors in *Lactobacillus plantarum*. Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J.; Quiberoni, A.
 - IV Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA (Montevideo, 2009). Estrategias clásicas y novedosas para la inactivación de bacteriofagos en la industria láctea. Briggiler Marcó, M.; Quiberoni, A.; Suárez, V.; Guglielmotti, D.; Capra, M.L.; Reinheimer, J.
 - XII Congreso Argentino de Microbiología (Buenos Aires, 2010). Mutantes espontáneos fago resistentes de *Lactobacillus plantarum*. Aislamiento y caracterización de la fagoresistencia. Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J.; Quiberoni, A.
 - XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTAL) (Buenos Aires, 2011). Elaboración de leche fermentada con variantes fagoresistentes de *Lactobacillus plantarum*. Briggiler Marcó, M.; Mercanti, D.; Guglielmotti, D.; Reinheimer, J.; Quiberoni, A.
-

ÍNDICE



Índice

RESUMEN	1
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	10
1. BACTERIAS LÁCTICAS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA FERMENTATIVA	10
2. FUNCIONES DE LOS CULTIVOS INICIADORES	11
2.1. PRODUCCIÓN DE ACIDEZ.....	11
2.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	11
2.3. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.....	12
2.4. DESARROLLO DE FLAVOR	12
2.5. FORMACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS	13
2.6. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES	13
3. ALIMENTOS LÁCTEOS FERMENTADOS	15
3.1. LECHE FERMENTADAS	15
3.2. QUESOS	17
4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DEL CULTIVO INICIADOR	18
4.1. LECHE COMO MEDIO DE CRECIMIENTO	18
4.2. INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DEL CULTIVO INICIADOR	19
5. BACTERIAS NO PERTENECIENTES AL FERMENTO (NSLAB)	20
6. PROBIÓTICOS	21
6.1. DEFINICIÓN	21
6.2. ALIMENTOS FUNCIONALES	22
6.2.1. Leches fermentadas probióticas	24
6.2.2. Quesos probióticos	25
6.2.3. Productos congelados probióticos	26
6.2.4. Productos probióticos no-lácteos.....	26
7. <i>Lactobacillus plantarum</i> EN LA INDUSTRIA FERMENTATIVA	27
8. <i>Lactobacillus plantarum</i> COMO MICROFLORA NSLAB EN PRODUCTOS LÁCTEOS	30
9. <i>Lactobacillus plantarum</i> COMO CULTIVO PROBIÓTICO	30
10. <i>Lactobacillus plantarum</i> EN PRODUCTOS FERMENTADOS	33
10.1. PRODUCTOS LÁCTEOS.....	33
10.1.1. Leches fermentadas	33
10.1.2. Quesos	34
10.2. PRODUCTOS VEGETALES.....	35
10.2.1. Chucrut.....	36
10.2.2. Kimchi.....	37
10.2.3. Kocho	37
10.2.4. Pepinillos salados	37
10.2.5. Aceitunas verdes en salmuera	38
10.3. PRODUCTOS A BASE DE CEREALES	38
10.3.1. Sourdough	39
10.3.2. Ogi.....	39
10.3.3. Togwa.....	40
10.3.4. ProViva	40
10.4. PRODUCTOS CÁRNICOS	41
10.5. PRODUCTOS A BASE DE PESCADO.....	42
OBJETIVOS	43

CAPÍTULO I: Infecciones fágicas en *Lactobacillus plantarum*

INTRODUCCIÓN	44
1. LOS BACTERIOFAGOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA FERMENTATIVA	44
2. ESTRUCTURA DE LOS FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS	46
3. CARACTERIZACIÓN DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS	48
4. CICLOS DE MULTIPLICACIÓN FÁGICA	51
4.1. CICLO LÍTICO.....	52
4.1.1. Adsorción	52
4.1.2. Penetración del ADN fágico.....	54
4.1.3. Biosíntesis de componentes virales y maduración de la partícula fágica	55
4.1.4. Lisis de la cepa hospedadora	56
4.2. CICLO LISOGÉNICO	57
5. MECANISMOS DE FAGORRESISTENCIA	59
5.1. BLOQUEO DE LA ADSORCIÓN	59
5.2. INHIBICIÓN DE LA INYECCIÓN DEL ADN FÁGICO	61
5.3. RESTRICCIÓN/MODIFICACIÓN (R/M).....	61
5.4. SISTEMAS CRISPRS	63
5.5. INFECCIÓN ABORTIVA (ABI)	65
6. BACTERIOFAGOS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	66
MATERIALES Y MÉTODOS	69
1. CEPAS	69
1.1. CONSERVACIÓN Y REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS	69
2. BACTERIOFAGOS	70
3. METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE FAGOS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	70
3.1. CONSERVACIÓN DE LOS FAGOS.....	70
3.2. PROPAGACIÓN DE LOS FAGOS	70
3.3. TITULACIÓN DE FAGOS	71
4. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS	71
4.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	71
4.1.1. Extracción del ADN fágico	72
4.1.2. Perfiles de restricción	73
4.1.3. Secuenciamiento del genoma fágico	73
4.1.4. Purificación de los fagos	74
4.1.5. Identificación de proteínas estructurales	75
4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	76
4.3. VIABILIDAD DURANTE CONSERVACIÓN	76
4.4. VIABILIDAD A DISTINTOS VALORES DE PH.....	76
4.5. VIABILIDAD A DISTINTAS TEMPERATURAS.....	76
5. INTERACCIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i> CON SUS FAGOS ESPECÍFICOS	77
5.1. INFLUENCIA DE LOS CATIONES DIVALENTES Ca^{2+} Y Mg^{2+} EN EL CICLO LÍTICO DE LOS FAGOS.....	77
5.1.1. Lisis en medio líquido	77
5.1.2. Formación de placas de lisis en medio sólido	77
5.2. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE HOSPEDADORES.....	78
5.3. CICLOS DE MULTIPLICACIÓN FÁGICA (BURST SIZE)	78
5.4. CARACTERIZACIÓN DE LA ADSORCIÓN	79
5.4.1. Adsorción del fago B1 sobre <i>Lactobacillus plantarum</i> WCSF1 y LMG9211	81
5.4.2. Influencia del calcio	81
5.4.3. Influencia de la temperatura.....	81

5.4.4.	Influencia del pH.....	82
5.4.5.	Influencia de un tratamiento térmico sobre las células.....	82
5.4.6.	Influencia del estado fisiológico celular.....	83
5.5.	EVIDENCIA DE SISTEMAS DE RESTRICCIÓN/MODIFICACIÓN EN <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	84
5.6.	ESTUDIO SOBRE PAREDES CELULARES.....	85
5.6.1.	Preparación de las paredes celulares.....	85
5.6.2.	Microtécnica de recuento bacteriano en placa.....	86
5.6.3.	Calibración de las paredes celulares.....	86
5.6.4.	Tratamientos selectivos sobre paredes celulares.....	87
5.6.5.	Ensayos de adsorción.....	87
5.6.6.	Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas.....	88
5.6.7.	Ensayo de neutralización fágica con monosacáridos.....	88
5.6.8.	Ensayos de competencia y desorción con monosacáridos en la adsorción de los fagos sobre <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.....	89
5.6.9.	Ensayos con lectinas.....	90
RESULTADOS.....		91
1. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS.....		91
1.1.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	91
1.1.1.	Perfiles de restricción.....	91
1.1.2.	Secuenciamiento del genoma fágico.....	91
1.1.3.	Identificación de proteínas estructurales.....	105
1.2.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	108
1.3.	Viabilidad durante la conservación.....	108
1.4.	VIABILIDAD A DISTINTOS VALORES DE PH.....	110
1.5.	VIABILIDAD A DISTINTAS TEMPERATURAS.....	111
2. INTERACCIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i> CON SUS FAGOS ESPECÍFICOS.....		111
2.1.	INFLUENCIA DE LOS CATIONES DIVALENTES Ca^{2+} Y Mg^{2+} EN EL CICLO LÍTICO DE LOS FAGOS.....	111
2.1.1.	Lisis en medio líquido.....	111
2.1.2.	Formación de placas de lisis en medio sólido.....	112
2.2.	DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE HOSPEDADORES.....	113
2.3.	CICLOS DE MULTIPLICACIÓN FÁGICA (BURST SIZE).....	113
2.4.	CARACTERIZACIÓN DE LA ADSORCIÓN.....	114
2.4.1.	Adsorción del fago B1 sobre <i>Lactobacillus plantarum</i> WCSF1 y LMG9211.....	116
2.4.2.	Influencia del calcio.....	117
2.4.3.	Influencia de la temperatura.....	117
2.4.4.	Influencia del pH.....	117
2.4.5.	Influencia de un tratamiento térmico sobre la célula bacteriana.....	118
2.4.6.	Influencia del estado fisiológico celular.....	118
2.5.	EVIDENCIA DE SISTEMAS RESTRICCIÓN/MODIFICACIÓN EN <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	120
2.6.	ESTUDIOS SOBRE PAREDES CELULARES.....	123
2.6.1.	Ensayos de adsorción sobre paredes tratadas química y enzimáticamente.....	123
2.6.2.	Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas.....	124
2.6.3.	Identificación de receptores fágicos en <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.....	125
DISCUSIÓN.....		126
 CAPÍTULO II: Estrategias para enfrentar infecciones fágicas		
INTRODUCCIÓN.....		139
1. PROBLEMÁTICA DE LAS INFECCIONES FÁGICAS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.....		139
2. ESTRATEGIAS PARA DISMINUIR LA INCIDENCIA DE INFECCIONES FÁGICAS.....		140
2.1.	DISEÑO DE LA PLANTA.....	140
2.2.	EQUIPAMIENTO DE LA PLANTA.....	141
2.3.	HIGIENE DE LA PLANTA.....	141
2.4.	TRATAMIENTO DE LA LECHE.....	144

2.5. MEDIOS INHIBIDORES DE FAGOS	145
2.6. SELECCIÓN DE CEPAS	145
2.7. OBTENCIÓN DE CEPAS CON RESISTENCIA FÁGICA MEJORADA	147
2.7.1. Mutantes espontáneos fagorresistentes.....	147
2.7.2. Transconjugantes.....	148
2.7.3. Cepas modificadas genéticamente.....	149
2.7.4. Cepas insensibles a fagos: cepas salvajes.....	149
MATERIALES Y MÉTODOS	150
1. CEPAS	150
1.1. CONSERVACIÓN Y REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS	151
2. BACTERIOFAGOS	151
3. METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS.....	151
3.1. CONSERVACIÓN DE LOS FAGOS.....	151
3.2. PROPAGACIÓN DE LOS FAGOS	151
3.3. TITULACIÓN DE FAGOS	152
4. RESISTENCIA TÉRMICA Y QUÍMICA DE LOS BACTERIOFAGOS	153
4.1. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN TÉRMICA	153
4.2. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN QUÍMICA	154
5. INACTIVACIÓN FOTOQUÍMICA Y FOTOCATALÍTICA DE BACTERIOFAGOS	154
5.1. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FOTOQUÍMICA/FOTOCATALÍTICA.....	154
5.2. MEDIDA DEL FLUJO DE ENERGÍA RADIANTE NETA	157
5.3. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN SUPERFICIAL DE FOTONES (SRPA)	157
6. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>.....	158
6.1. METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN EL AISLAMIENTO DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES	159
6.1.1. Medio agarizado (MA).....	159
6.1.2. Cultivos secundarios (CS).....	159
7. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO FAGORRESISTENCIA	160
7.1. CONFIRMACIÓN DE LA FAGORRESISTENCIA	160
7.2. EFICIENCIA EN LA RECUPERACIÓN DE MUTANTES FAGORRESISTENTES.....	160
7.3. ESTABILIDAD DE LA FAGORRESISTENCIA.....	160
7.4. NIVEL DE FAGORRESISTENCIA (EOP, EFFICIENCY OF PLAQUING)	161
7.5. LISOGENIA.....	161
7.5.1. Liberación espontánea de partículas fágicas	161
7.5.2. Inducción de profagos con mitomicina C.....	161
7.6. TASAS DE ADSORCIÓN FÁGICA.....	161
8. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES	162
8.1. MORFOLOGÍA	162
8.2. ESPECTRO DE HOSPEDADORES DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES	162
8.3. ESTUDIOS GENÉTICOS.....	162
8.3.1. Extracción del ADN total bacteriano	162
8.3.2. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction)	163
8.4. CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA	164
8.4.1. Selección de un medio de cultivo para desarrollo de los mutantes fagorresistentes.....	164
8.4.2. Desarrollo de los mutantes fagorresistentes en medios de base láctea	164
8.4.3. Empleo de mutantes fagorresistentes en minielaboración de leche fermentada.....	165
RESULTADOS	166
1. RESISTENCIA TÉRMICA Y QUÍMICA DE LOS BACTERIOFAGOS	166
1.1. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN TÉRMICA	166

1.2. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN QUÍMICA	167
2. INACTIVACIÓN FOTOQUÍMICA Y FOTOCATALÍTICA.....	169
2.1. INACTIVACIÓN FOTOQUÍMICA DE FAGOS DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	169
2.2. ENSAYOS DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS	170
2.3. MEDIDA DEL FLUJO DE ENERGÍA RADIANTE NETA	172
2.4. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN SUPERFICIAL DE FOTONES (SRPA)	173
2.5. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA	174
3. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	177
4. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO FAGORRESISTENCIA	177
4.1. CONFIRMACIÓN DE LA FAGORRESISTENCIA Y EFICIENCIA EN LA RECUPERACIÓN DE MUTANTES	177
4.2. ESTABILIDAD DE LA FAGORRESISTENCIA.....	178
4.3. NIVEL DE FAGORRESISTENCIA (EOP, EFFICIENCY OF PLAQUING)	179
4.4. LISOGENIA.....	179
4.4.1. Liberación espontánea de partículas fágicas	179
4.4.2. Inducción de profagos con mitomicina C.....	179
4.5. TASAS DE ADSORCIÓN FÁGICA.....	180
5. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES	181
5.1. MORFOLOGÍA	182
5.2. ESPECTRO DE HOSPEDADORES DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES	182
5.3. ESTUDIOS GENÉTICOS.....	183
5.3.1. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction)	183
5.4. CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA	185
5.4.1. Selección de un medio de cultivo para desarrollo de los mutantes fagorresistentes.....	185
5.4.2. Desarrollo de los mutantes fagorresistentes en medios de base láctea	185
5.4.3. Empleo de mutantes fagorresistentes en una minielaboración de leche fermentada	187
DISCUSIÓN.....	189
CONCLUSIONES	197
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	199

Abreviaturas y símbolos

Abi	Infección abortiva (Abortive infection)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácidos ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosina (Adenosine Triphosphate)
BAL	Bacterias ácido-lácticas
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
CNRZ	Centre National de la Recherche Zootechnique
ConA	Concanavalina A
CS	Cultivos secundarios
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
°D	Grados Dornic
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EOP	Eficiencia de plaqueo (Efficiency of plaquing)
EPS	Exopolisacáridos
HC	Hidrolizado de caseína
hs	horas
HTST	Alta temperatura, corto período de tiempo (High Temperature Short Time)
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masas en tándem (Tandem Mass Spectrometry)
LDR	Leche descremada reconstituída
LTLT	Baja temperatura, largo período de tiempo (Low Temperature Long Time)
MA	Medio agarizado
MWCO	Molecular Weigth Cut off
MM	Peso Molecular Teórico
m.o.i.	Dosis infectiva (Multiplicity of Infection)
MRS	Man Rogosa Sharp

Abreviaturas y símbolos

min	minutos
NSLAB	Bacterias lácticas no adicionadas con el fermento (Non Starter Lactic Acid Bacteria)
ORF	Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilenglicol
PG	Peptidoglicano
pI	Punto isoeléctrico
PIM	Medios inhibidores de fagos (Phage Inhibitory Media)
PIR	Respuesta de irradiación en el pico
q	Flujo local de energía radiante
R	Reflectancia
RAPD	Amplificación al azar del ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)
R/M	Restricción/Modificación
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SRPA	Velocidad de absorción superficial de fotones
T	Transmitancia
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Tracto gastrointestinal
TMG	Tris-magnesio-gelatina
UFC	Unidades formadores de colonias
UFP	Unidades formadores de placas
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
UV	Ultravioleta
UV-A	Radiación ultravioleta de onda larga (o luz negra)
UV-C	Radiación ultravioleta de onda corta (o germicida)
α	Fracción de energía absorbida
η	Eficiencia de inactivación fotocatalítica
λ	Longitud de onda
Φ	Bacteriofago

Microorganismos

B. *Bifidobacterium*

E. *Escherichia*

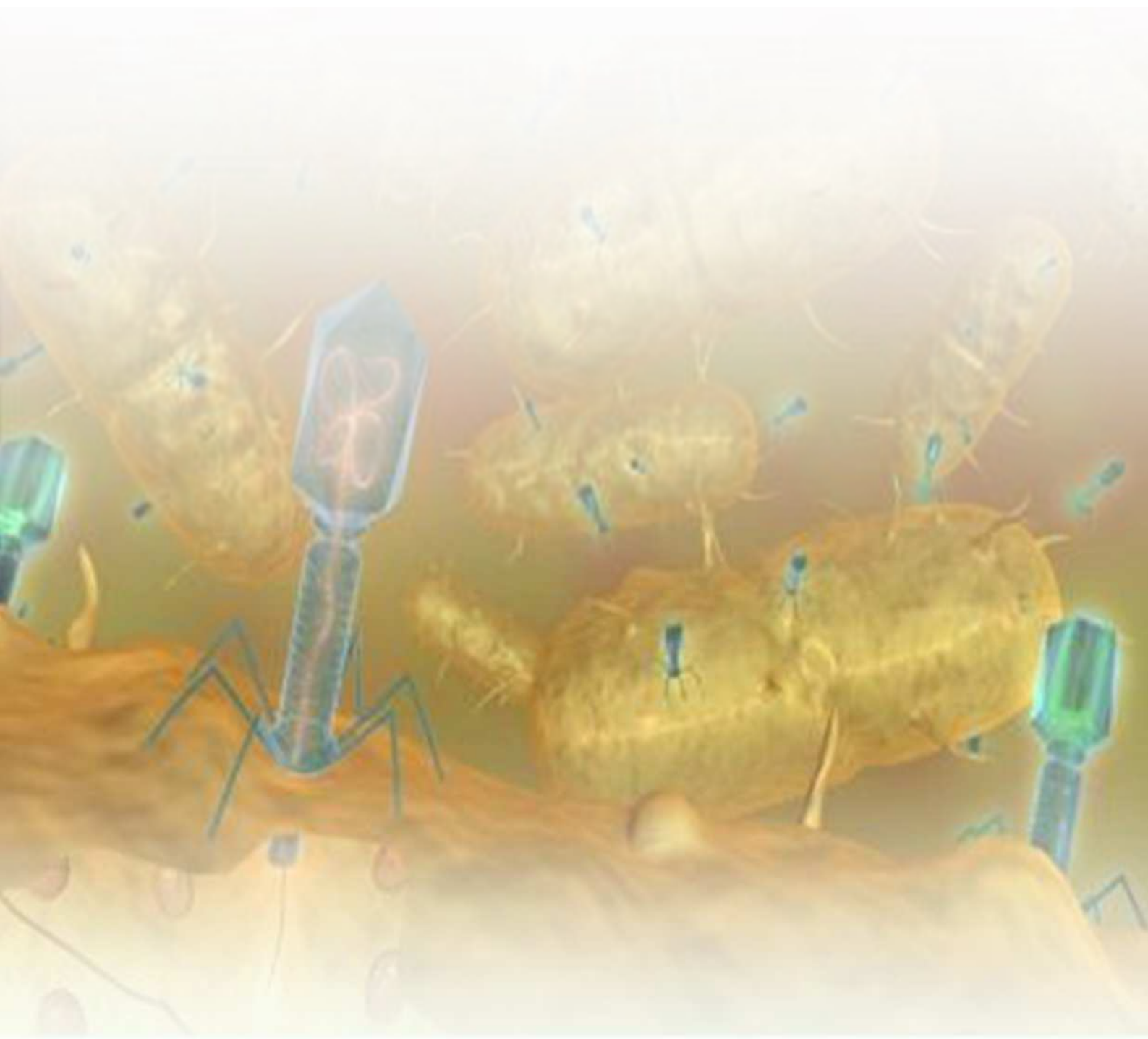
L. *Lactococcus*

Lb. *Lactobacillus*

Lc. *Leuconostoc*

St. *Streptococcus*

RESUMEN



RESUMEN

El género *Lactobacillus* es ampliamente usado en la elaboración de alimentos fermentados ya que contribuye con el flavor y la textura de los productos. Además, la producción de compuestos ácidos orgánicos y la disminución del pH en los alimentos actúan como barrera protectora frente al ataque de microorganismos patógenos. En los últimos años, la importancia industrial del género *Lactobacillus* se ha incrementado como consecuencia de su empleo como cultivos probióticos.

En particular, *Lactobacillus plantarum* es comúnmente encontrado formando parte de la microflora natural de alimentos fermentados (lácteos, vegetales, cárnicos, cereales) o bien agregado a la materia prima como cultivo iniciador o adjunto. En ambos casos, contribuye con el desarrollo de las características organolépticas de los productos.

Adicionalmente, para una gran variedad de cepas de *Lb. plantarum* se han documentado propiedades probióticas. Es por ello que en la actualidad se comercializan alimentos funcionales conteniendo esta especie bacteriana.

Por lo tanto, el empleo de *Lb. plantarum* llevando a cabo el doble rol (starter/probiótico) podría presentar ventajas frente a otros cultivos probióticos disponibles en el mercado, los cuales, en general, evidencian dificultades para desarrollar en la leche. Sin embargo, esto podría dar lugar a infecciones fágicas que podrían generar características no deseadas en los productos finales. En consecuencia, sería indispensable ejercer estrictos controles en las plantas elaboradoras de alimentos que utilicen esta especie bacteriana. Para ello, es necesario contar con información referida a los fagos que infectan *Lb. plantarum* a los fines de poder desarrollar estrategias adecuadas de control. Sin embargo, los fagos de *Lb. plantarum* han sido escasamente estudiados.

Es por esto que, este trabajo tuvo como objetivo la caracterización fenotípica y genotípica de fagos de *Lb. plantarum* así como también el estudio de su interacción con cepas sensibles.

En primer lugar, se realizó la caracterización molecular de 2 fagos de colección (B1 y B2) de *Lb. plantarum* la cual incluyó la determinación del mecanismo de empaquetamiento del ADN fágico, el secuenciamiento de los genomas y la identificación de sus proteínas estructurales. Adicionalmente, se obtuvieron micrografías electrónicas a los fines de conocer la morfología de ambos fagos. El fago B1 evidenció un tamaño de genoma de 38 kb y un mecanismo de empaquetamiento del tipo *pac* mientras que el tamaño del genoma del fago B2

fue superior (80 kb) y el mecanismo de empaquetamiento de su ADN fue del tipo *cos*. Con respecto a la identificación de proteínas estructurales, para el fago B1 fueron asociadas 13 proteínas mientras que para el fago B2 fueron identificadas 9. Adicionalmente, en el genoma del fago B2 fueron encontrados 6 ARNt. De acuerdo a las micrografías electrónicas, ambos fagos forman parte de la familia *Siphoviridae*, observándose mayores dimensiones de la cabeza y la cola para el fago B2 y la presencia de fibras para el fago B1.

Por otro lado, se estudió la viabilidad durante la conservación a diversas temperaturas y valores de pH de los fagos de colección y de dos fagos aislados previamente de gránulos de kefir (FAGK1 y FAGK2). En cuanto al almacenamiento de las suspensiones fágicas congeladas, se observó una tendencia a favor de la temperatura -80°C aunque a -20°C se observó una buena conservación de la viabilidad fágica. Los 4 fagos evidenciaron elevada infectividad en un rango de pH de 4 a 11 y aún a temperaturas de 50°C .

Con respecto a la interacción de los fagos con las cepas sensibles, se llevó a cabo el estudio de la influencia de cationes divalentes en la lisis celular y en la formación de placas de lisis, determinándose además el rango de hospedadores. Adicionalmente, se evaluaron los parámetros de multiplicación fágica y se caracterizó la etapa de adsorción. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios para evidenciar la presencia de mecanismos de fagorresistencia del tipo R/M. La lisis celular de *Lb. plantarum* ATCC 8014 ocurrió aún en ausencia de iones divalentes, aunque en presencia de calcio fue más veloz. Sin embargo, en medio agarizado y en ausencia de cationes, fue difícil visualizar la presencia de placas de lisis y se obtuvieron disminuciones en los títulos fágicos en comparación a los obtenidos en presencia de calcio. Con respecto a la determinación del espectro de hospedadores, la mayoría de las cepas resultó sensible al fago B2. En cuanto a los parámetros de multiplicación fágica, se observaron períodos de latencia de entre 20 y 40 min, tiempos de burst de entre 80 y 90 min y burst sizes de entre 11 y 39 UFP/centro de infección (para los fagos B1, FAGK1 y FAGK2) y de 133 UFP/centro de infección para el fago B2. Los ensayos de adsorción se llevaron a cabo para las cepas *Lb. plantarum* ATCC 8014, WCSF1, LMG9211 y PLN con los fagos B1 y B2. Todos los sistemas alcanzaron elevadas tasas de adsorción (99%) dentro de los 45 min, a excepción de los sistemas WCSF1/ Φ B1 y LMG9211/ Φ B1. Estos sistemas requirieron tiempos prolongados (5 hs) para alcanzar una adsorción de 92% y además evidenciaron la presencia de mecanismos de fagorresistencia del tipo R/M.

Para la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 se estudió la influencia de factores ambientales y fisiológicos sobre la adsorción de los 4 fagos (B1, B2, FAGK1 y FAGK2). Para todos los sistemas se evidenció el mismo comportamiento. La etapa de adsorción fue

escasamente afectada por la presencia de calcio, aunque se redujo a temperaturas de 50°C y valores de pH de 9 y 10. Por otro lado, el tratamiento térmico aplicado sobre las células produjo una disminución en las tasas de adsorción. Sin embargo, el tratamiento de las células con cloranfenicol (inhibidor de la síntesis de proteínas) no afectó la adsorción de las partículas fágicas sobre la superficie celular. Por lo tanto, la adsorción fágica no requeriría de células en estado metabólico activo y posiblemente la disminución encontrada cuando se utilizaron células tratadas térmicamente se debe a la naturaleza termosensible del receptor y no a la pérdida de viabilidad de la cepa.

Con el objetivo de conocer la naturaleza de los receptores fágicos involucrados en la infección fágica sobre *Lb. plantarum* ATCC 8014, se realizaron estudios de adsorción con paredes celulares tratadas con diversos agentes químicos. Posteriormente, para identificar los receptores se llevaron a cabo estudios de inhibición con monosacáridos, ensayos de desorción y competencia y, finalmente, estudios con lectinas. Las tasas de adsorción fágica se vieron disminuidas al trabajar con paredes celulares tratadas con mutanolisina y TCA, por lo que los receptores presentarían naturaleza hidrocarbonada. Además, esta etapa de la infección sería irreversible debido a que no se observó tendencia a la desorción espontánea de las partículas fágicas previamente adsorbidas a paredes celulares no tratadas. Sin embargo, los ensayos de inhibición con diversos azúcares, los estudios de competencia y desorción así como también los experimentos utilizando lectinas no permitieron obtener resultados concluyentes en cuanto a la identificación de los azúcares presentes en los receptores fágicos.

En el segundo capítulo de esta tesis, se estudió el comportamiento de los fagos frente a diferentes estrategias que podrían utilizarse para disminuir el riesgo de infecciones fágicas. Esto incluyó el estudio de la resistencia fágica a tratamientos térmicos (utilizando diversos medios de suspensión), químicos y fotocatalíticos, así como también el aislamiento de mutantes espontáneos fagoresistentes con aptitudes tecnológicas. En particular, la eficiencia de la fotocatalisis en la inactivación fágica fue evaluada para fagos de diversas especies de bacterias lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii*) debido a la escasa información existente con respecto a este proceso aplicado sobre fagos.

Con respecto a los tratamientos térmicos, los fagos de *Lb. plantarum* estudiados evidenciaron resistencia a los procesos de pasteurización y su comportamiento, en general, fue independiente del medio de suspensión utilizado. Sin embargo, el tratamiento a 90°C durante 5 min produjo la eliminación completa de las partículas fágicas. En los tratamientos

con agentes químicos, los alcoholes (etanol e isopropanol) no fueron eficientes en la destrucción viral mientras que el hipoclorito de sodio (800 ppm) eliminó las partículas fágicas dentro de los 30 min. El biocida más eficiente fue el ácido peracético ya que logró la inactivación completa de los fagos en cortos tiempos (< 5 min). La eficiencia de procesos fotocatalíticos en la inactivación fágica fue fago-dependiente. Los fagos más sensibles forman parte de las especies *Lb. plantarum* y *St. thermophilus* mientras que los más resistentes pertenecen a *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii*. En particular, para los fagos de *Lb. plantarum*, la fotocatálisis resultó más efectiva que la aplicación de radiación UV (sin catalizador) ya que en el primer caso se observó la eliminación total de las partículas fágicas mientras que con procesos fotoquímicos se logró sólo una inactivación parcial (reducción de entre 2,3 y 3 órdenes logarítmicos).

Finalmente, se aislaron 81 mutantes fagorresistentes a partir de las cepas *Lb. plantarum* ATCC 8014 y PLN, utilizando los fagos B1 y B2, ya sea de manera individual o conjunta (cócteles de fagos). En general, el método en medio agarizado fue más eficiente para el aislamiento de los mutantes que el método de cultivo secundario. El nivel de fagorresistencia de las variantes obtenidas fue muy bueno, lo cual puede evidenciarse a través de elevados valores de EOP (Efficiency of plaquing). Sin embargo, los niveles de estabilidad de la fagorresistencia fueron más variables. Las variantes espontáneas aisladas utilizando el fago B1 o cócteles de fagos evidenciaron mayor estabilidad que las obtenidas utilizando el fago B2 solamente.

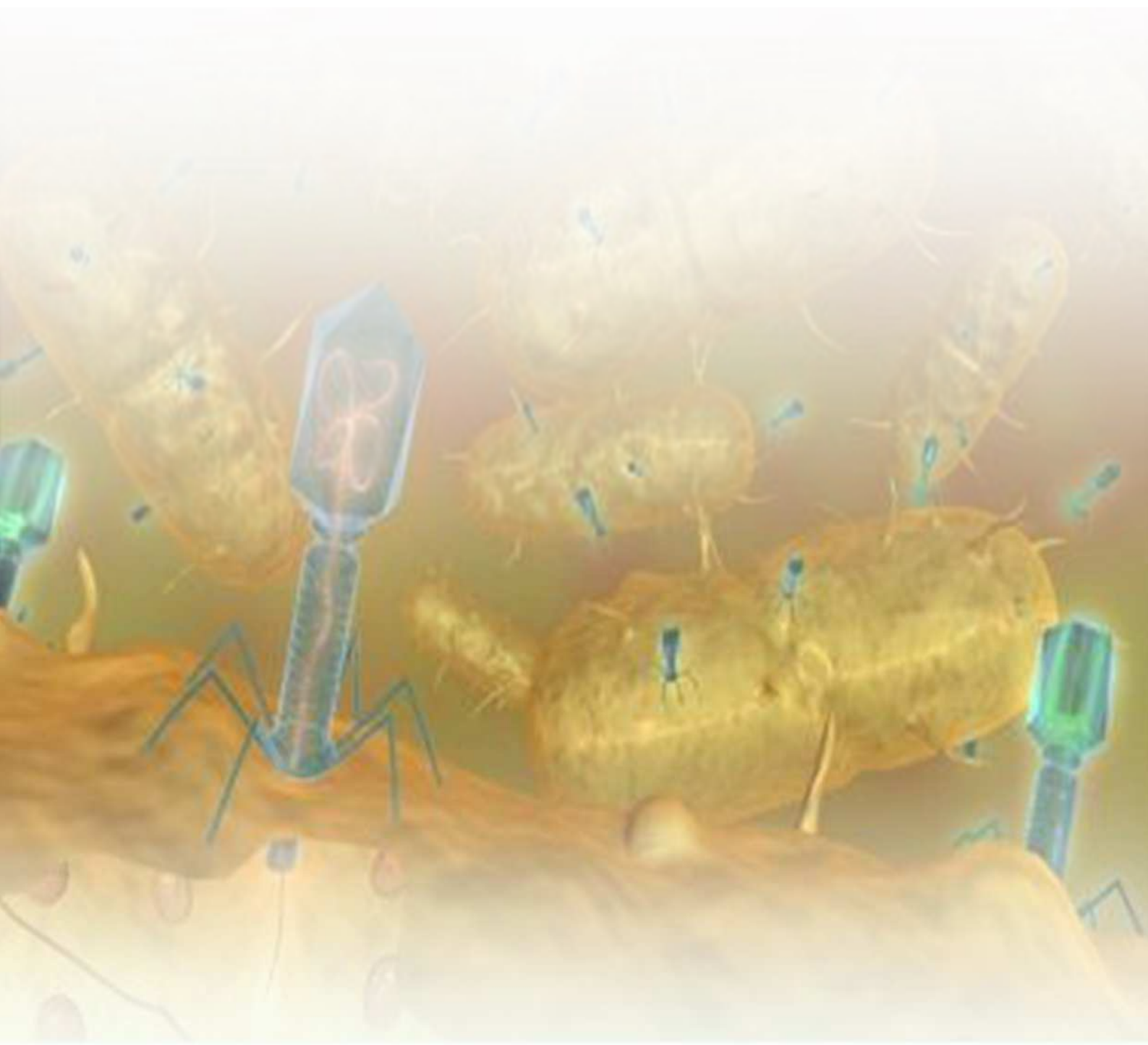
En cuanto a la identificación de mecanismos involucrados en la resistencia fágica de los mutantes, en algunos casos fue posible evidenciar liberación espontánea de partículas fágicas, aunque no fue un fenómeno repetitivo. En general, los mutantes aislados a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014 evidenciaron bajas tasas de adsorción, lo que sugiere que presentan un mecanismo de resistencia asociado al bloqueo de la adsorción. Sin embargo, los mutantes obtenidos a partir de *Lb. plantarum* PLN evidenciaron elevados valores de adsorción, por lo que el mecanismo de resistencia fágica actuaría en una etapa posterior.

Para llevar a cabo los estudios tecnológicos, se seleccionaron 10 mutantes (aislados a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014) que evidenciaron elevados niveles de fagorresistencia y bajas tasas de adsorción. Los perfiles RAPD-PCR de estos 10 mutantes revelaron una elevada homología genética con su cepa madre. Estos mutantes fueron capaces de desarrollar en un medio de cultivo a base de leche, alcanzando bajos valores de pH y elevada acidez a las 24 hs. En particular, un mutante fue seleccionado y utilizado para evaluar su performance durante la elaboración de leche fermentada, en presencia de fagos (B1 + B2). El mutante alcanzó

elevados recuentos (10^9 UFC/ml) y bajos valores de pH (4,5) dentro de las 7,5 hs de incubación en presencia de una concentración inicial de fagos de 10^4 UFP/ml, los cuales no fueron capaces de propagarse durante este período de tiempo. Durante el almacenamiento refrigerado (13°C por 21 días) el pH del producto se mantuvo en 3,8, el mutante mantuvo su viabilidad y los títulos fágicos permanecieron constantes.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten profundizar los conocimientos referidos a infecciones fágicas en *Lb. plantarum*, los cuales serían necesarios si esta especie bacteriana es utilizada en el desarrollo de alimentos funcionales. Por otro lado, este trabajo demostró que es posible el aislamiento de variantes fagorresistentes con adecuadas propiedades tecnológicas.

SUMMARY



SUMMARY

Lactobacilli are widely used in a variety of food fermentation processes where they contribute to the flavor and texture of final products. The production of organic acids and the resulting low pH protect fermented products from spoilage microorganisms.

In addition, the industrial relevance of lactobacilli has been enhanced by their use as probiotic. In particular, *Lactobacillus plantarum* is commonly found as part of the natural microflora of fermented foods (dairy, vegetables, and meat). However, this species may also be added as starter or adjunct culture, in both cases improving the organoleptic characteristics of the products. Additionally, many *Lb. plantarum* strains possess probiotic properties, and functional foods which include them are marketed nowadays.

Thus, *Lb. plantarum* could be used as a probiotic starter culture in the production of functional foods, with the advantage of its good ability to grow in milk when compared to most currently used probiotic strains. However, the increasing use of *Lb. plantarum* as a starter or adjunct culture can lead to bacteriophage infections in industrial environments, with adverse effects on the final product. Consequently, efficient control measures to minimize problems caused by phage attacks on *Lb. plantarum* strains become essential. In order to carry out successful anti-phage strategies, a deep knowledge about *Lb. plantarum* phages is needed but, however, available data are still scarce.

Considering all these facts, the aim of this work was to carry out a phenotypic and genotypic characterization of *Lb. plantarum* bacteriophages, and to study their interaction with sensitive strains.

Firstly, a molecular characterization (including DNA packaging mechanisms, genome sequencing and structural protein identification) of two *Lb. plantarum* collection phages (B1 and B2) was carried out. In addition, electron microscopy allowed determining phage morphology. Phage B1 genome size was 38 kDa and seemed to present a *pac*-type DNA packaging mechanism, whereas phage B2 was a *cos*-type phage and exhibited a longer genome size (80 kDa). Additionally, 6 tRNAs were found in phage B2 genome. Regarding to structural protein identification, 13 and 9 proteins were associated to phage B1 and B2, respectively. According to the morphologies detected by electron microscopy, both phages belong to the *Siphoviridae* family, being head and tail bigger for phage B2.

Phage viability throughout storage at different pH and temperature was determined for collection phages and for phages FAGK1 y FAGK2 (isolated from kefir grains). Results

evidenced that -80°C was the best temperature for preservation of phage suspensions, though high phage viability at -20°C was similarly observed. Additionally, the four phages exhibited high viability either at 50°C or at pH values ranging from 4 to 11.

To characterize the interaction between phages and their sensitive strains, the following aspects were studied: influence of divalent cations during the lytic cycle, host spectrum, one step growth curves, characterization of the adsorption step and presence of restriction-modification (R/M) systems. Cell lysis of *Lb. plantarum* ATCC 8014 was achieved even without addition of divalent ions, but it was faster in the presence of Ca^{2+} . In absence of calcium ions, diffuse and small lysis plaques as well as lower phage titres were obtained. Most of the strains tested during the host range assay were sensitive to the phage B2. Regarding one step growth curves, multiplication phage parameters obtained were: 20-40 min for latent periods, 80-90 min for burst times, and burst sizes from 11 to 9 PFU/infected center (for phages B1, FAGK1 and FAGK2) and of 133 PFU/infected center for phage B2. Adsorption assays of phages B1 and B2 were carried out on four *Lb. plantarum* strains (ATCC 8014, WCSF1, LMG9211 y PLN). Adsorption values obtained were of 99% within 45 min, except for WCSF1/ Φ B1 and LMG9211/ Φ B1 systems. These systems required very long incubations (5 h) to efficiently adsorb (adsorption of 92%) phage particles and, in addition, exhibited R/M phage resistance mechanisms.

The influence of environmental and physiological parameters on adsorption of phages B1, B2, FAGK1 and FAGK2 on *Lb. plantarum* ATCC 8014 was studied. The same behavior was observed for the four systems. Phage adsorption was independent of calcium ions but was affected either at 50°C or at high pH values (9 and 10). Adsorption rates decreased after thermal inactivation of cells, but were not affected by chloramphenicol (synthesis-protein inhibitor) treatment, so the diminished phage adsorption observed on thermally treated cells could be linked to a disorganization of phage receptor sites.

In order to investigate the chemical nature of phage receptors on *Lb. plantarum* ATCC 8014, adsorption tests using chemically treated cell walls were carried out. To identify the phage receptors several studies were accomplished: phage inhibition by saccharides, competition and desorption of phages with saccharides and, finally, influence of lectins on phage adsorption. Adsorption rates were diminished on cell walls treated with mutanolysin and TCA, suggesting that major components of receptors were carbohydrate in nature. Moreover, this step seems to be irreversible due to the absence of spontaneous release of phages already attached to receptor sites. No conclusive results were obtained when either

phage inhibition by saccharides, competition and desorption assays or studies with lectins were carried out.

In the second chapter of this Thesis, the behavior of phages subjected to thermal, chemical and photocatalytic treatments, used to diminish the frequency of phage infections, was studied. Thermal resistance of phages was evaluated in several suspension media. Due to the scarce available data about phage inactivation using photocatalysis, this methodology was studied for phages infecting diverse species of lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii*). Also, the isolation of phage-resistant mutants with adequate technological properties was carried out. Regarding to thermal treatments, *Lb. plantarum* phages were resistant to pasteurization processes and their behavior was, in general, independent of the suspension medium used. However, a complete phage inactivation was achieved after treatment at 90°C for 5 min. Concerning to the use of biocides, alcohols (ethanol and isopropanol) were not efficient to inactivate phage particles, whereas counts were undetectable after 30 min with sodium hypochlorite (800 ppm free chlorine). Peracetic acid was the most efficient biocide to fast and completely inactivate phage suspensions (< 5 min).

The efficiency of the photocatalytic treatment on phage inactivation was dependent on the phage studied; whereas the lowest inactivation rate corresponded to *Lb. plantarum* and *St. thermophilus* phages, the highest was found for *Lb. helveticus* and *Lb. delbrueckii* phages. In the particular case of *Lb. plantarum* phages, photocatalysis was more efficient than photochemical treatment (UV irradiation without catalytic compound), the former leading to a complete phage inactivation whereas only a partial inactivation was reached with the latter.

Finally, 81 phage-resistant mutants were isolated from *Lb. plantarum* ATCC 8014 and PLN strains using two phages (B1 and B2), either separately or mixed in a phage cocktail. In general, the agar plate method proved to be more efficient than the secondary culture method for the recovery of confirmed phage-resistant variants. High levels of resistance and variable stability were observed on mutants. Particularly, variants isolated using phage B1 or the phage cocktail exhibited higher stability than those obtained with phage B2.

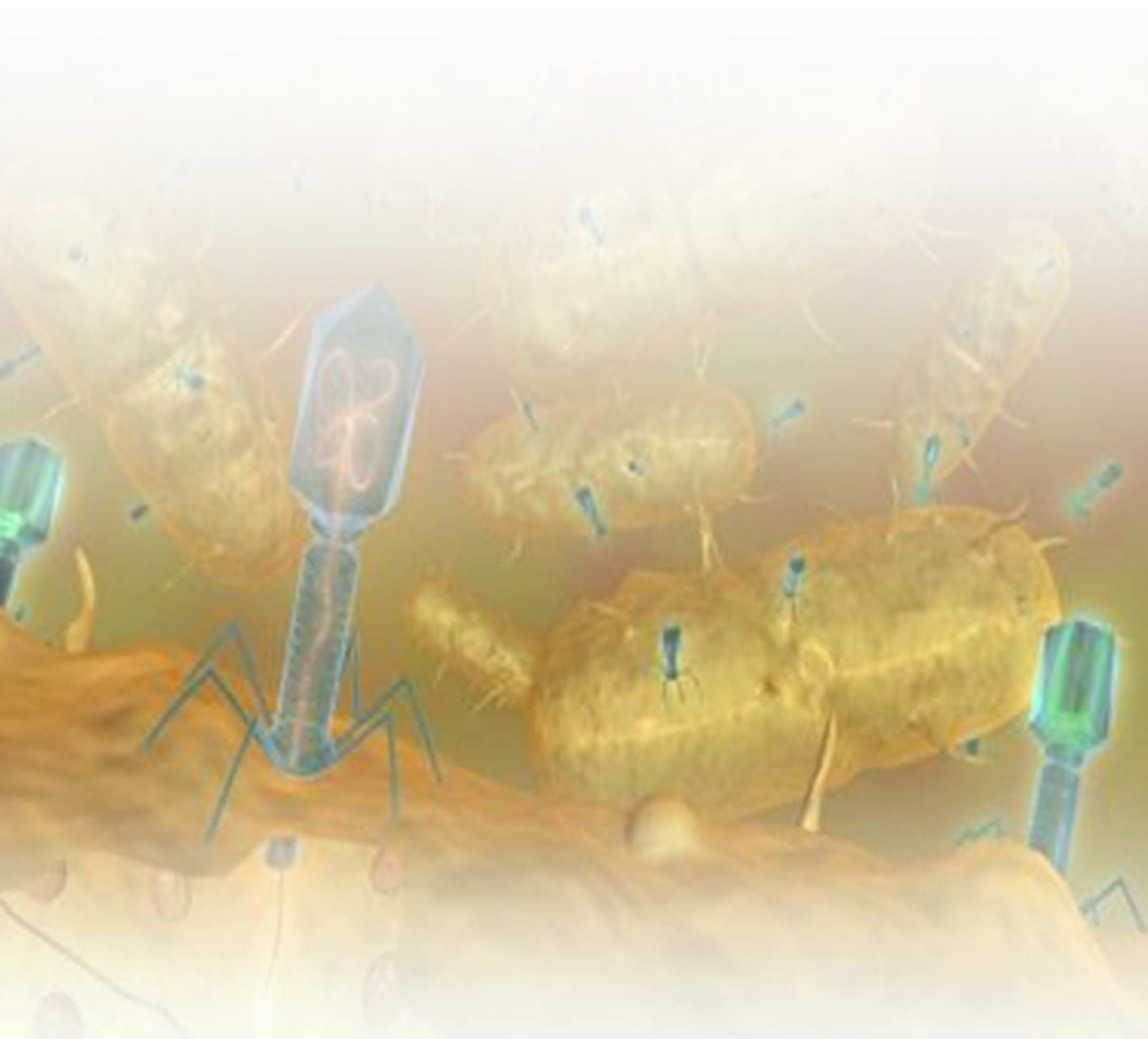
Regarding to the identification of mechanisms involved in phage resistance of the mutants, free phages were detected in the supernatants of some variants. In general, mutants from *Lb. plantarum* ATCC 8014 were completely or partially unable to adsorb phage particles, suggesting the presence of phage-resistant mechanisms linked to adsorption

blocking. However, variants obtained from *Lb. plantarum* PLN showed high adsorption rates. In this case, the resistance mechanisms would act in a subsequent step.

In order to carry out technological studies, 10 mutants isolated from *Lb. plantarum* ATCC 8014 with high levels of resistance and low adsorption rates were selected. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR) revealed a strong genetic homology between *Lb. plantarum* 8014 and each phage-resistant mutant. All the mutants developed acidity as fast as the parent strain, lowering pH in a milk-based medium. The ability of the selected mutant MC4 (obtained by using the phage cocktail) to resist phage infection during fermented milk manufacture was investigated. Mutant strain MC4 grew up to 10^9 CFU/ml and reduced pH to a value of 4.5 within 7.5 h in the presence of an initial concentration of 10^4 PFU/ml of phage particles. Phages were not able to propagate during the fermentation process. Both strain MC4 viability and phage titres, as well as pH (3.8), remained constant throughout the entire refrigerated storage period (13°C for 21 d).

Results obtained in this work significantly contributed to improve the knowledge about phage infections on *Lb. plantarum*, which would be useful if this bacterial species is used in the manufacture of functional foods. On the other hand, this work demonstrated that the assayed methodologies are efficient for obtaining spontaneous phage-resistant mutants from *Lb. plantarum* strains with adequate technological properties.

INTRODUCCIÓN GENERAL



INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Bacterias lácticas en la industria láctea fermentativa



Figura 1. Productos lácteos fermentados.

Las bacterias del ácido láctico (BAL) componen los cultivos iniciadores (starters) utilizados en la industria láctea. Los cultivos iniciadores llevan a cabo los procesos fermentativos durante la elaboración de productos lácteos fermentados como quesos y leches fermentadas (Figura 1). Si bien la microflora presente naturalmente en la leche, y que sobrevive a los tratamientos aplicados a la materia prima durante la

elaboración del producto, puede contribuir al proceso de fermentación, los cultivos iniciadores pueden llevar a cabo este proceso de una manera más controlada y efectiva (Carminati y col., 2010).

Además, las bacterias lácticas son utilizadas en la fermentación de matrices cárnicas y vegetales, en donde llevan a cabo el proceso de acidificación, ejercen efectos asociados a la preservación y mejoran el aroma, textura y sabor de estos alimentos (Franz y col., 2011).

Las características de interés al momento de seleccionar los cultivos que serán utilizados a nivel industrial dependerán del tipo de alimento a producir. En general, se busca que los cultivos generen una rápida acidificación durante la elaboración aunque una mínima producción de acidez durante la distribución y almacenamiento, formen adecuados flavor y textura, sean capaces de adaptarse a diferentes condiciones de manufactura, sean resistentes a fagos, estén libres de contaminantes y mantengan la viabilidad durante la preparación y vida útil del producto (Suroño y Hosono, 2011).

Las bacterias lácticas comprenden los géneros *Lactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Azcarate-Peril y Klaenhammer, 2010). Sin embargo, los géneros asociados con alimentos son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* (Franz y col., 2011).

2. Funciones de los cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores constituyen el “corazón” de los productos lácteos fermentados (Surono y Hosono, 2011). Su función principal es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa (azúcar mayoritario de la leche). Además, pueden contribuir a las características organolépticas del producto a través del desarrollo de compuestos de aroma, los cuales pueden derivar de la fermentación de la lactosa y del citrato, de la degradación de las proteínas y de la grasa de la leche, y del metabolismo de sus aminoácidos y ácidos grasos (Carminati y col., 2010; De Angelis y Gobbetti, 2011).

Las funciones llevadas a cabo por los cultivos iniciadores se detallan a continuación.

2.1. Producción de acidez

La producción de ácido láctico ocurre en la fase temprana de la elaboración de leches fermentadas y quesos. El camino a través del cual la lactosa es utilizada es especie y, en algunos casos, cepa-dependiente y está determinado por una combinación de sistemas de transporte y de enzimas (De Angelis y Gobbetti, 2011).

Como consecuencia de la generación de ácido láctico, el pH disminuye, lo que produce el fenómeno de coagulación y afecta la textura del producto. Por otro lado, el bajo pH alcanzado y la acidez generada durante la fermentación, así como también la actividad antimicrobiana de moléculas de ácido láctico no disociadas, eliminan y previenen el desarrollo de microorganismos alterantes o patógenos determinando la calidad del producto final (Carminati y col., 2010; De Angelis y Gobbetti, 2011).

2.2. Actividad proteolítica

Las BAL son frecuentemente calificadas como “fastidiosas” ya que presentan requerimientos nutricionales complejos. Debido a su limitada capacidad de biosíntesis necesitan de azúcares fácilmente fermentables (fuente de C), aminoácidos y péptidos cortos (fuente de N), vitaminas B y nucleótidos (factores de crecimiento) para lograr un adecuado desarrollo (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004).

Como la concentración de aminoácidos en la leche está por debajo de los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de las bacterias lácticas, éstas han desarrollado un sistema proteolítico complejo. Los componentes principales del sistema proteolítico son proteinasas asociadas a la pared celular, sistemas de transporte de péptidos y aminoácidos y peptidasas intracelulares. En primer lugar, las bacterias utilizan los polipéptidos generados a partir de la caseína por acción de las enzimas que participan en la

coagulación de la leche y de las proteinasas de la pared celular bacteriana. Luego, los péptidos y aminoácidos generados son transportados a través de la membrana al interior de la célula utilizando sistemas de transporte específicos. Finalmente los péptidos son hidrolizados por las peptidasas citoplasmáticas (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; De Angelis y Gobbetti, 2011).

Si bien la actividad proteolítica de las BAL es escasa, los aminoácidos generados pueden contribuir con el desarrollo de flavor en diversos productos lácteos. Por lo tanto, los aminoácidos cumplen un doble rol, por un lado constituyen una fuente de energía y por otro son precursores de aroma (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; De Angelis y Gobbetti, 2011).

2.3. Actividad lipolítica

Aunque la actividad lipolítica de las BAL es escasa, poseen enzimas esterolíticas/lipolíticas intracelulares capaces de hidrolizar determinados ácidos grasos (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; De Angelis y Gobbetti, 2011).

Los lípidos juegan un rol importante en el flavor de los quesos, actuando como fuente de ácidos grasos libres, los cuales posteriormente pueden ser catabolizados a otros compuestos de flavor (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; De Angelis y Gobbetti, 2011).

2.4. Desarrollo de flavor

Los compuestos del flavor en leches fermentadas son principalmente ácidos orgánicos (láctico y acético) y el acetaldehído generado a partir de aminoácidos. Sin embargo, el impacto en la producción de compuestos de flavor en quesos es más complejo debido al catabolismo del lactato y citrato. Además, los péptidos y aminoácidos libres generados por proteólisis pueden ser metabolizados a compuestos volátiles por lo que, en este caso, el rol de los microorganismos es indirecto (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004).

El lactato es un importante sustrato para una serie de reacciones que pueden contribuir de manera positiva o negativa. Puede ser metabolizado por las bacterias lácticas, dependiendo de la cepa, a acetato, etanol, ácido fórmico y dióxido de carbono. Además, el lactato puede ser oxidado a acetato dependiendo de la población microbiana y de la disponibilidad de O₂. Por otro lado, el citrato puede ser metabolizado a diacetilo, acetato, acetoína, 2,3-butilenglicol y dióxido de carbono. Debido a la formación de diacetilo, el metabolismo del citrato es muy importante en el desarrollo de flavor de manteca y de ciertos tipo de quesos (De Angelis y Gobbetti, 2011).

En el catabolismo de los aminoácidos libres participan enzimas decarboxilasas, transaminasas, deaminasas, liasas y dehidratasas. En particular, el catabolismo de

aminoácidos aromáticos por parte de bacterias lácticas puede producir compuestos de flavor no deseables como p-cresol, indol, escatol y aminas biógenas como tiramina y triptamina, perjudiciales para la salud del consumidor (De Angelis y Gobbetti, 2011).

2.5. Formación de exopolisacáridos

Algunas BAL producen exopolisacáridos (EPS), los cuales aumentan la calidad reológica de productos lácteos fermentados, principalmente de leches fermentadas. En particular, los EPS evitan la sinéresis del coágulo, afectando las propiedades físicas como firmeza, viscosidad, suavidad y la estabilidad del gel. Debido a estas propiedades, en algunos casos, los EPS pueden reemplazar a los estabilizantes usados en la elaboración de yogur. Adicionalmente, los EPS formados alrededor de la superficie celular disminuyen la difusión del ácido láctico hacia fuera de la célula, lo cual genera una disminución en la producción de acidez, y previene la sobreacidificación en leches fermentadas. Sin embargo, en determinadas condiciones, como por ejemplo el empleo de temperaturas elevadas, la producción de EPS por parte de las BAL puede ser inestable (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Carminati y col., 2010; Surono y Hosono, 2011).

Entre las bacterias productoras de EPS se pueden mencionar *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium infantis*. Uno de los EPS más estudiado es el bifidano producido por *Bifidobacterium bifidum* (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Carminati y col., 2010; Surono y Hosono, 2011).

Si bien la composición química de los EPS varía de una cepa a otra, en general, contienen galactosa y glucosa. Sin embargo, en algunos casos se han encontrado otros compuestos como glicerol, fósforo o proteínas. En particular, los cultivos del yogur producen mucopolisacáridos y contienen mayoritariamente glucosa y galactosa con cantidades menores de fructosa, manosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y N-acetilgalactosamina (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Carminati y col., 2010; Surono y Hosono, 2011).

2.6. Producción de compuestos inhibidores

Como se mencionó anteriormente, los ácidos orgánicos provenientes de la fermentación de azúcares son los responsables de la obtención de una buena calidad de alimentos fermentados, debido a que pocas bacterias son capaces de crecer en condiciones de elevada acidez y bajo pH. Por lo tanto, la reducción del pH así como también la producción

de lactato y acetato por parte de las bacterias, cumplen la primera función inhibitoria. Además, algunas cepas pueden producir otros compuestos inhibitorios, aunque en menores cantidades. Entre ellos se pueden mencionar dióxido de carbono, etanol y peróxido de hidrógeno. Además, este último puede reaccionar con tiocianato en una reacción catalizada por lactoperoxidasa para formar productos de oxidación como hipotiocianato que también presenta actividad inhibitoria de microorganismos (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Carminati y col., 2010; De Angelis y Gobbetti, 2011).

El diacetilo, si bien es un compuesto de aroma, también presenta actividad inhibitoria contra levaduras y bacterias Gram negativas y Gram positivas no lácticas; sin embargo, debido a que se necesitan concentraciones muy elevadas para que lleve a cabo su efecto inhibitorio, su uso puede resultar problemático en alimentos (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Carminati y col., 2010; De Angelis y Gobbetti, 2011).

Las **bacteriocinas** producidas por BAL son péptidos de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas. Representan un grupo heterogéneo en cuanto a su modo y espectro de acción, propiedades químicas y bacterias que las producen. Son termoestables, sensibles a las proteasas y presentan un estrecho rango de acción (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Carminati y col., 2010; De Angelis y Gobbetti, 2011). Si bien existen diversas clasificaciones de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, la mayoría de ellas pueden ser agrupadas en dos clases: clase I (bacteriocinas que contienen lantionina, denominadas lantibióticos) y clase II, que comprende un grupo amplio de péptidos lineales no modificados. En particular, los lantibióticos son péptidos pequeños, estables al calor, que contienen residuos pocos comunes incluyendo lantionina y β -metillantionina (Collins y col., 2010).

Las bacteriocinas tienen dos aplicaciones principales en la elaboración de quesos: incrementar la seguridad del queso a través de la inhibición de microorganismos patógenos y mejorar la calidad del producto a través de la inhibición de microorganismos alterantes. Además, el empleo de bacteriocinas puede disminuir la sobreacidificación a través de la lisis del cultivo iniciador. El cultivo productor de bacteriocina puede ser agregado en la tina durante la elaboración o bien posteriormente a ella, mediante el pulverizado sobre la superficie de los quesos. En el primer caso, estos cultivos no deberían encontrarse en una elevada concentración durante la elaboración para evitar la inhibición del cultivo iniciador; sin embargo, su número debería alcanzar altos niveles los primeros días posteriores a la elaboración para producir elevadas concentraciones de bacteriocinas que inhiban a los microorganismos no deseables (De Angelis y Gobbetti, 2011).

Si bien la nisina de *L. lactis* es la bacteriocina más ampliamente estudiada, también se han encontrado otras bacteriocinas provenientes de *St. thermophilus*, *Lactobacillus* y enterococos. Algunos autores han encontrado que las bacteriocinas pueden controlar contaminaciones con *Listeria monocytogenes* y prevenir la hinchazón tardía de los quesos debida a clostridios. En particular, algunas cepas de *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* producen bacteriocinas contra clostridios, *Staphylococcus aureus* y *Listeria* sp. (De Angelis y Gobbetti, 2011).

Sin embargo, la producción de compuestos inhibidores por parte de bacterias lácticas puede traer ciertos problemas en quesos. Por ejemplo, *Lactobacillus casei* y *Lb. rhamnosus* producen acetato, ácido fórmico y pequeñas cantidades de diacetilo a partir de citrato que, si bien presentan actividad inhibitoria frente a microorganismos de contaminación, también podrían contribuir de manera negativa con el crecimiento de *Propionibacterium freudenreichii* en quesos suizos. Por otro lado y como se mencionó anteriormente, si los cultivos productores de bacteriocinas son incluidos formando parte del cultivo primario, podrían inhibir a las otras cepas pertenecientes al fermento (Carminati y col., 2010).

3. Alimentos lácteos fermentados

3.1. Leches fermentadas

La leche destinada a la elaboración de leches fermentadas puede ser adicionada de proteínas del suero u otros sólidos lácteos (para aumentar el contenido de sólidos) así como también de azúcar, edulcorante, frutas, preservantes y estabilizadores del color. El proceso de fermentación involucra la inoculación de la leche pasteurizada con el cultivo iniciador y una incubación a 40-44°C durante aproximadamente 4 o 5 hs. Durante la fermentación se produce ácido láctico a partir de la lactosa, lo que produce una disminución en el pH, la desestabilización de la caseína, su coagulación a un pH de 4,6 y la obtención de un producto con características organolépticas (sabor y aroma) adecuadas. Como consecuencia de la fermentación se generan diacetilo y acetaldehído que le otorgan a las leches fermentadas su flavor característico (Van de Water y Naiyanetr, 2008; De Angelis y Gobbetti, 2011). Además, algunas cepas producen EPS que, como se mencionó anteriormente, modifican la textura del producto por incremento de la viscosidad (Van de Water y Naiyanetr, 2008; De Angelis y Gobbetti, 2011; Robison, 2011).

Las leches fermentadas exhiben una amplia variedad de texturas, desde productos líquidos como el kefir y leche acidófila hasta diferentes tipos de yogur (líquido, batido y firme) (Van de Water y Naiyanetr, 2008).

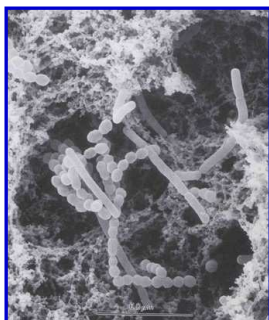


Figura 2.
Microorganismos
utilizados para la
elaboración de
yogur.

En particular, el yogur es una leche fermentada en cuya elaboración se emplean dos microorganismos como cultivo iniciador, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *St. thermophilus*, en una relación que varía dependiendo del producto (Figura 2). De acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration, USA), estos dos microorganismos deben estar presentes para que el producto reciba la denominación de yogur (Van de Water y Naiyanetr, 2008). Debido a la protooperación o relación simbiótica, la producción de ácido es mayor cuando ambos microorganismos se utilizan juntos en comparación a la producida por cada uno de ellos de manera individual (Surono y Hosono, 2011). Esto se debe a que cada especie favorece el desarrollo de la otra. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* estimula el crecimiento de *St. thermophilus* por la liberación de péptidos y aminoácidos a partir de las proteínas de la leche, lo que permite que este microorganismo desarrolle rápidamente durante la primera etapa de la fermentación. Por otro lado, el ácido fórmico producido por *St. thermophilus* estimula el desarrollo de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* resultando en una disminución del tiempo de fermentación y la obtención de un producto con características diferentes a las obtenidas cuando se usa una sola especie bacteriana (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Van de Water y Naiyanetr, 2008). Si bien *St. thermophilus* comienza con la producción de acidez, la mayor cantidad de ácido láctico es producida por *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Robison, 2011).

Como se mencionó anteriormente, las BAL presentan una escasa actividad proteolítica; sin embargo, es importante para la liberación de péptidos y aminoácidos que contribuirán con el desarrollo bacteriano. Si bien los lactobacilos son más proteolíticos, ambos microorganismos contienen peptidasas y el principal sustrato para la proteólisis es la caseína, aunque las proteínas del suero también pueden ser hidrolizadas. En general, el contenido de vitaminas y minerales no es alterado durante el procesamiento aunque debido a la pasteurización algunas vitaminas son destruidas y otras disminuyen su concentración durante el almacenamiento refrigerado del yogur (Van de Water y Naiyanetr, 2008).

Adicionalmente, en la elaboración de leches fermentadas se pueden utilizar otras bacterias lácticas como *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus paracasei*. Sin embargo, ellas se utilizan como cultivos probióticos, con el objetivo de otorgar beneficios a la salud del consumidor y no como cultivos acidificantes debido a que, en general, no producen acidez rápidamente (De Angelis y Gobbetti, 2011; Surono y Hosono, 2011).

3.2. Quesos

Durante la elaboración de quesos, los cultivos iniciadores producen un rápido desarrollo de acidez que es esencial para la formación del gel a partir de la caseína. Además, durante la maduración de los quesos, contribuyen con el desarrollo de adecuados flavor y textura. Las bacterias que se utilizan como cultivos iniciadores en quesos pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Los cultivos mesófilos consisten de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* y son usados para la elaboración de quesos que involucran bajas temperaturas de cocción (< 40°C) como quesos Gouda y Edam entre otros. En cambio, para quesos que requieren elevadas temperaturas de cocción como los quesos Mozzarella, Parmigiano y quesos del tipo Suizo, se utilizan cultivos termófilos como *St. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* con el objetivo de que sobrevivan al procesamiento y continúen con la producción de acidez en la cuajada refrigerada. Por otro lado, cuando se busca la formación de ojos, se utilizan especies generadoras de gas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* o *Leuconostoc mesenteroides* (Heller y col., 2008; De Angelis y Gobbetti, 2011). *Lb. helveticus* y algunas cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* cumplen además, un rol adicional en algunas variedades de quesos donde es importante remover la galactosa producida por *St. thermophilus*, debido a que este azúcar puede generar amarronamiento no deseable o bien una fermentación secundaria en el producto final (De Angelis y Gobbetti, 2011).

Para la producción de algunos quesos tradicionales en Europa, se utilizan fermentos artesanales o naturales, cuya microflora es muy compleja y está integrada tanto por bacterias lácticas como no lácticas. Su composición es imposible de conocer con exactitud, sólo se conocen las especies dominantes. Sin embargo, algunas de sus cepas presentan propiedades tecnológicas de interés (resistencia a fagos y capacidad de producir aromas, entre otras). Los fermentos naturales pueden ser de suero o de leche, dependiendo del sustrato y técnica usados para su propagación:

Fermento de suero (Suero fermento): se obtiene incubando toda la noche el suero de elaboraciones anteriores a una temperatura aproximada de 45°C, alcanzando un pH final de 3,3. Sin embargo, de acuerdo al tipo de queso elaborado puede haber algunas modificaciones en el proceso. La acidez de este fermento es muy elevada, por ello se utiliza para la elaboración de quesos duros y la microflora dominante está integrada principalmente por *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* y *St. thermophilus* (Carminati y col., 2010).

Fermento de leche (Leche fermento): se utiliza para la elaboración de quesos blandos o semiduros debido a que su acidez es inferior a la presente en fermentos de suero. Incluye la pasteurización de la leche y su incubación a temperaturas que van desde 37°C hasta 45°C. En este tipo de fermentos, la especie predominante es *St. thermophilus* (Carminati y col., 2010).

Sin embargo, las fluctuaciones que se producen en la composición de los fermentos naturales podrían generar productos de características y calidad variables. Una alternativa para evitar este problema es el empleo de fermentos seleccionados, los cuales están constituidos por escaso número de cepas perfectamente caracterizadas y no presentan contaminantes. En este caso, si la calidad de la leche no varía y se mantienen buenas prácticas de higiene se pueden obtener productos con características adecuadas y constantes debido a que el fermento está controlado y estandarizado. Este tipo de fermento se puede utilizar para todo tipo de quesos y leches fermentadas aunque con ciertas limitaciones de acuerdo al tipo de materia prima y volumen de leche manejado (escala de producción) (Carminati y col., 2010).

4. Factores que influyen en la actividad del cultivo iniciador

Como se indicó con anterioridad, los cultivos iniciadores juegan el rol más importante en la determinación de la calidad y propiedades finales del producto. Por lo tanto, la selección del tipo de cultivo iniciador y la forma de uso son esenciales para cada planta en particular (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004). Sin embargo, la actividad de los cultivos iniciadores puede verse influenciada por diversos factores.

4.1. Leche como medio de crecimiento

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, las BAL presentan requerimientos nutricionales complejos por lo que necesitan medios de cultivo ricos en proteínas, carbohidratos, lípidos y vitaminas, tal es el caso de la leche, suero u otro medio de cultivo formulado (Surono y Hosono, 2011). Si bien las BAL pueden crecer en la leche, en algunos casos, ésta no es un medio óptimo. Sin embargo, con el agregado de extracto de levadura, se pueden estimular su crecimiento y la producción de ácido láctico (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004).

Además de los azúcares y proteínas de la leche, las vitaminas y el nitrógeno no proteico, juegan un papel importante sobre la nutrición de las bacterias lácticas. Sin embargo, la concentración de los compuestos de nitrógeno no proteico presentes en la leche es

insuficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de las BAL. Por otro lado, los requerimientos de vitaminas varían de una especie a otra (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004).

Adicionalmente, la variación de la composición de leche provocada por cambios estacionales, podría alterar la actividad fisiológica de los microorganismos y, por lo tanto, afectar de manera negativa su desarrollo (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004).

4.2. Inhibidores de la actividad del cultivo iniciador

Diversos factores endógenos y exógenos pueden afectar la actividad del cultivo iniciador en el tanque de fermentación, tina o durante el proceso de elaboración, conduciendo a pérdidas económicas y una pobre calidad del producto. Estos factores incluyen la presencia de compuestos inhibidores naturales de la leche (lacteninas, aglutininas, lisozima, sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno) los cuales son generalmente destruidos con un tratamiento térmico adecuado antes de la manufactura. Además, las variaciones en la composición de la leche causada por mastitis (altos recuentos de células somáticas), leches con alta rancidez hidrolítica, presencia de oxígeno disuelto, residuos de antibióticos y de agentes de limpieza (hipoclorito de sodio o compuestos de amonio), peróxido de hidrógeno adicionado o generado microbiológicamente, bacteriofagos, bacteriocinas y los inhibidores inducidos por calor también pueden afectar la actividad del cultivo iniciador. De manera adicional, una baja producción de acidez puede ser debida a fluctuaciones en la temperatura de incubación, sobreacidificación o variaciones estacionales en la composición de la leche que podrían disminuir la concentración de micronutrientes. Otro de los factores a considerar es la compatibilidad entre las diferentes especies utilizadas en la elaboración ya que pueden generar bacteriocinas activas contra otras especies del cultivo iniciador (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; De Angelis y Gobbetti, 2011; Surono y Hosono, 2011).

El calentamiento de la leche y las buenas prácticas de manufactura combinadas con procedimientos de control de calidad han minimizado el efecto de la mayoría de estos factores. Sin embargo, los más importantes son todavía la presencia de residuos de antibióticos y de bacteriofagos. Los antibióticos usados en el control de la mastitis pueden provocar grandes pérdidas económicas a nivel industrial debido al retraso en la actividad acidificante del cultivo iniciador. Los niveles de antibióticos requeridos para inhibir la actividad bacteriana son cepa-dependiente. Además, su presencia en la materia prima puede originar graves problemas en la salud de los consumidores, como reacciones alérgicas, desórdenes intestinales y resistencia bacteriana (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Surono y

Hosono, 2011). En cuanto a los bacteriofagos, este tema se desarrollará en forma detallada más adelante.

5. Bacterias no pertenecientes al fermento (NSLAB)

Las bacterias no pertenecientes al fermento (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB) crecen de manera natural en los quesos y pueden provenir de la leche o del ambiente de elaboración. Es un grupo heterogéneo que está constituido por especies mesófilas y termófilas, homofermentantes y heterofermentantes, siendo los lactobacilos generalmente los que dominan la microflora (Heller y col., 2008; De Angelis y Gobbetti, 2011). Si bien la pasteurización usualmente elimina los lactobacilos presentes en la materia prima, puede existir una recontaminación proveniente de los equipos, personal y del ambiente durante la elaboración, la cual, en algunos casos, es muy difícil de prevenir. Por ello es muy frecuente encontrar lactobacilos no pertenecientes al fermento, no sólo en quesos elaborados con leche cruda, sino también en aquellos elaborados con leche pasteurizada. Esta población microbiana que inicialmente es pequeña, puede alcanzar niveles muy elevados (10^6 - 10^8 UFC/g) si se otorga una temperatura de maduración adecuada. Sin embargo, no todos los lactobacilos son capaces de desarrollar en las condiciones presentes en la matriz quesera de bajo pH, elevada concentración salina o de utilizar los sustratos disponibles en ella. Un limitado número de especies cumplen estas características y en su mayoría son lactobacilos mesófilos heterofermentantes como *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. rhamosus*, los cuales crecen en la mayoría de los quesos, y *Lactobacillus coryneformis*, *Lb. curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus bif fermentans* que desarrollan cuando la temperatura y la concentración salina son adecuadas (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Carminati y col., 2010; De Angelis y Gobbetti, 2011).

En quesos de corta maduración (inferior a 4 meses) y a una baja temperatura (inferior a 10°C) las NSLAB tienen poca influencia si los lactobacilos del cultivo iniciador se encuentran en elevados niveles en los primeros momentos posteriores a la elaboración. Sin embargo, en quesos de larga maduración (superior a 6 meses) las NSLAB pueden influir sobre el desarrollo de flavor (De Angelis y Gobbetti, 2011).

Si bien algunos autores sostienen que los lactobacilos NSLAB son los responsables de algunos defectos encontrados en quesos, como problemas de textura (cristales de lactato de calcio y rajaduras), riesgos a la salud (aminas biógenas) y defectos de flavor (off-flavor), en la mayoría de los casos realizan una contribución positiva durante el desarrollo de acidez y la maduración, actuando como cultivos adjuntos (De Angelis y Gobbetti, 2011). Es así que las

NSLAB tienen un fuerte impacto sobre la calidad de los quesos. Sin embargo, debido a la variabilidad, número y composición de especies, la contribución de estas bacterias es difícil de caracterizar en detalle. En general, presentan escasa actividad proteolítica y lipolítica y su principal contribución al flavor es la habilidad para oxidar lactato a acetato. Además, pueden producir diacetilo y reducir acetaldehído y propionaldehído a alcoholes (Heller y col., 2008).

Por otro lado, la actividad proteolítica secundaria de las NSLAB es intensa, y se evidencia por una elevada actividad de peptidasas, lo que permite incrementar la concentración de aminoácidos libres que contribuyen al desarrollo de flavor en determinados quesos (Carminati y col., 2010; Corsetti y Valmorri, 2011; De Angelis y Gobbetti, 2011).

6. Probióticos

6.1. Definición

Además de las actividades descritas anteriormente y desarrolladas por las bacterias lácticas, las mismas pueden ser utilizadas como cultivos probióticos.

De acuerdo a la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Food and Agriculture Organization of the United Nations), se define como “probiótico” a todo microorganismo vivo que cuando es administrado en cantidades adecuadas confiere beneficios a la salud del consumidor (FAO/WHO 2002). Por lo tanto, una amplia variedad de géneros y especies pueden ser considerados como probióticos, aunque la mayoría de las cepas disponibles comercialmente, corresponden a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y, en particular, a las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* y *Lactobacillus salivarius* (Franz y col., 2011).

Los parámetros a tener en cuenta para determinar si una cepa es probiótica son numerosos y variables. Además de las propiedades probióticas deberían poseer ciertas aptitudes tecnológicas y fisiológicas. Las más importantes se detallan a continuación (Kearney y col., 2008; Franz y col., 2011):

- ❖ Ser de origen humano
- ❖ Presentar status GRAS (Generally recognized as safe)
- ❖ Efectos probióticos documentados
- ❖ No ser patógeno
- ❖ Adhesión a la mucosa intestinal
- ❖ Sensibilidad a antibióticos
- ❖ Resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (tolerancia a jugo gástrico y bilis)

- ❖ Tolerancia térmica, al ácido láctico y oxígeno
- ❖ Resistencia a fagos
- ❖ Actividad metabólica deseable
- ❖ Capacidad para usar fructooligosacáridos (FOSs)
- ❖ Tolerancia a sustancias antimicrobianas
- ❖ Propiedades sensoriales aceptables
- ❖ Retener la viabilidad y estabilidad durante el procesamiento de

alimentos, almacenamiento y posterior consumo.

Entre los beneficios reportados para los cultivos probióticos, se pueden citar disminución de los síntomas de intolerancia a la lactosa, prevención de síntomas de rotavirus y de diarrea asociadas a antibióticos, prevención y tratamiento de alergias, reducción de riesgos asociados a mutanogénesis y carcinogénesis, efecto hipocolesterolémico, inhibición de *Helicobacter pylory* y patógenos intestinales, prevención de inflamaciones intestinales y estimulación del sistema inmune.

En particular, la adhesión del cultivo probiótico a la mucosa intestinal permitiría mayores posibilidades de establecerse en el tracto gastrointestinal (TGI) para ejercer su función probiótica. Además, es considerada importante para la modulación del sistema inmunológico y para la exclusión de patógenos mediante la estimulación de su remoción del tracto intestinal infectado (Kearney y col., 2008; Carminati y col., 2010; Heath y col., 2011).

Adicionalmente, se deben realizar ensayos clínicos controlados y validados sobre el producto final para asegurar que las propiedades probióticas no se alteraron durante el procesamiento del alimento (Kearney y col., 2008).

6.2. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que ejercen beneficios para la salud del consumidor, siendo los más frecuentes aquellos que contienen cultivos probióticos. Estos productos están disponibles comercialmente y, en los últimos tiempos, han ganado mucha popularidad y aceptación en todo el mundo, con un mercado que está en continua expansión (Kearney y col., 2008).

Los alimentos fermentados, y en particular las leches fermentadas, son los más comunes para el transporte de bacterias probióticas. Sin embargo, los cultivos probióticos también pueden ser incluidos en quesos blandos, semiduros y duros, helados y postres lácteos congelados (Kearney y col., 2008; Franz y col., 2011).

Lactobacillus es la especie más comúnmente utilizada como cultivo probiótico en alimentos, mientras que *Bifidobacterium* se usa en menor medida debido a su sensibilidad al oxígeno y a las condiciones más estrictas que requiere para su crecimiento (Kearney y col., 2008).

Como se mencionó anteriormente, las BAL necesitan medios de cultivo ricos en nutrientes para su desarrollo. La composición de la leche satisface estos requerimientos para algunas bacterias, las cuales pueden alcanzar recuentos elevados. Sin embargo, otros microorganismos, como la mayoría de las cepas probióticas, no crecen bien en leche ya que el ambiente del TGI, del cual ellas son aisladas, es muy diferente al presente en esta materia prima (Carminati y col., 2010). Es así que, en general, los cultivos probióticos presentan escasa actividad proteolítica, incapacidad para fermentar la lactosa y carencia de adaptación a la matriz láctea. Por lo tanto, si sólo se utilizan cultivos probióticos para elaborar leches fermentadas, el producto carece de características sensoriales. Por esta razón, los cultivos probióticos se utilizan conjuntamente con los cultivos iniciadores tradicionales (Franz y col., 2011). Sin embargo, algunas cepas pertenecientes a *Lb. plantarum* y *Lb. casei* son capaces de crecer en sustratos lácteos y ejercer, además, el rol probiótico. En estos casos se pueden detallar ventajas desde el punto de vista económico y tecnológico (menor inóculo inicial, no necesitarían propagarse por tiempos prolongados disminuyendo, de esta manera, la frecuencia de ataques fágicos) (Carminati y col., 2010).

En consecuencia, la composición química del producto lácteo es esencial cuando se considera la actividad metabólica de los cultivos probióticos. Es decir, el tipo y cantidad de carbohidratos así como también el grado de hidrólisis de las proteínas y lípidos de la leche son variables esenciales para la propagación del cultivo probiótico. Es por ello que la leche se puede fortificar con fuentes de energía (glucosa), factores de crecimiento (extracto de levadura e hidrolizado de caseína), antioxidantes, minerales y vitaminas, para fomentar la multiplicación bacteriana. Además de la elección de un medio de cultivo adecuado, se pueden aplicar una serie de estrategias para favorecer el desarrollo de bacterias probióticas. Entre ellas, incrementar el nivel de inóculo o bien neutralizar de manera periódica el medio de cultivo hasta los valores iniciales de pH (6,5), durante la fermentación. Por otro lado, la incorporación de las bacterias probióticas a la matriz alimenticia puede ser problemática debido a la temperatura y presencia de ácido, sal, oxígeno. En este caso, algunas de las soluciones incluyen el uso de cepas con resistencia a la acidez, a la bilis, microencapsulación de las bacterias, adaptación al stress y uso de contenedores impermeables al oxígeno (Kearney y col., 2008; Heller y col., 2008; Carminati y col., 2010).

Adicionalmente, se debe tener en cuenta el efecto de los productos de fermentación generados por el cultivo iniciador, que pueden favorecer o no el desarrollo de los cultivos probióticos. En este caso, la interacción de los cultivos probióticos con los microorganismos del cultivo iniciador puede depender del momento en que los probióticos son adicionados (durante o posterior a la fermentación) (Heller y col., 2008; Kearney y col., 2008).

Debido a lo expuesto anteriormente, los procesos tecnológicos pueden afectar la viabilidad y funcionalidad de los cultivos probióticos. Es por ello que, en general, se prefiere adicionarlos como cultivos adjuntos en una concentración adecuada (10^7 UFC/ml) para garantizar su funcionalidad (Carminati y col., 2010).

6.2.1. Leches fermentadas probióticas

Varios autores reportaron efectos beneficiosos sobre el huésped como consecuencia del consumo de yogur y otras leches fermentadas (Kearney y col., 2008; Van de Water y Naiyanetr, 2008) (Figura 3). Una de las características probióticas se debe al efecto



Figura 3. Leches fermentadas probióticas.

antagónico contra microorganismos patógenos, producido por el ácido láctico generado. Otro de los efectos benéficos asociados con el consumo de leches fermentadas es la reducción en los síntomas de intolerancia a la lactosa

debido a la enzima β -galactosidasa producida por las bacterias. En este caso, en el intestino delgado, la bilis aumenta la permeabilidad de la pared celular bacteriana facilitando la salida de la enzima encargada de hidrolizar dicho azúcar (Van de Water y Naiyanetr, 2008).

Dependiendo del tipo de yogur, los cultivos probióticos pueden ser adicionados antes de la fermentación o bien una vez que el producto ya está refrigerado. Para favorecer el desarrollo de estos cultivos (principalmente bifidobacterias) se pueden agregar prebióticos (inulina, lactulosa y oligosacáridos). Los alimentos conteniendo ambos (probióticos y prebióticos) reciben el nombre de **alimentos simbióticos** (Kearney y col., 2008).

6.2.2. Quesos probióticos

Cuando los cultivos probióticos son adicionados a quesos, se debe asegurar su viabilidad luego del período de maduración y durante la vida útil del producto. Adicionalmente, se debería testear que estos microorganismos no produzcan metabolitos durante la elaboración y maduración que puedan alterar la actividad de los otros microorganismos presentes o influir de manera negativa en el flavor del producto (Kearney y col., 2008). Sin embargo, una de las ventajas que presenta la adición de cultivos probióticos en quesos es que la matriz proteica-grasa del producto, su capacidad buffer y baja acidez podrían contribuir a la viabilidad de los cultivos probióticos durante el pasaje por el TGI (Heller y col., 2008).



Figura 4. Quesos probióticos.

Las bacterias probióticas que son capaces de desarrollar en leche como *Lb. plantarum* y *Lb. casei* parecen candidatos ideales para ser incorporados a quesos. Si bien evidencian una baja actividad acidificante y una moderada actividad proteolítica, pueden alcanzar elevados niveles durante la maduración como resultado de su actividad peptidolítica, lo que otorga una intensidad del flavor

mejorada y altos niveles de aminoácidos libres en el producto final (Carminati y col., 2010).

Debido al proceso de elaboración, los quesos blandos parecen ideales para el transporte de cultivos probióticos debido a que no presentan maduración, el almacenamiento ocurre a temperaturas de refrigeración y el período de vida útil es corto. Existe una serie de quesos blandos disponibles en el mercado conteniendo lactobacilos y bifidobacterias como el Bioqueso (Argentina) y queso cottage “probiotic” (Alemania). Por otro lado, el agregado de probióticos en quesos madurados, en general, aportó resultados negativos en cuanto a la viabilidad bacteriana y los efectos sobre el flavor. Sin embargo, el agregado del cultivo probiótico junto con el cultivo iniciador, revirtió este comportamiento. En particular, los cultivos probióticos adicionados a quesos frescos y a quesos duros como Edam, Emmental, Cheddar y Gouda mantuvieron su viabilidad (Heller y col., 2008). En la Figura 4 se presentan quesos blandos y duros adicionados de cultivos probióticos.

6.2.3. Productos congelados probióticos

Cuando se adicionan bacterias probióticas a productos congelados y helados (Figura 5), se debe tener en cuenta el efecto del estrés provocado por el congelamiento sobre la viabilidad de los cultivos. Una alternativa es el uso de cultivos microencapsulados. Biogarde es un helado comercializado en Alemania que contiene *Lb. acidophilus*, *B. bifidum* y *St. thermophilus*. En este caso, el congelamiento presentó efectos escasos sobre la viabilidad celular, y los cultivos no afectaron el flavor y mantuvieron elevada viabilidad durante el almacenamiento por largos períodos de tiempo (Kearney y col., 2008).



Figura 5. Alimentos congelados probióticos.

6.2.4. Productos probióticos no-lácteos

Los cultivos probióticos pueden ser agregados en matrices no lácteas, como mayonesa, cereales, bebidas frutales y carne (Figura 6). En particular, el agregado de bifidobacterias a mayonesa permitió una disminución en el recuento de microorganismos totales, la inhibición de levaduras y mejoró las propiedades sensoriales. Cuando se adicionaron lactobacilos probióticos a jugos frutales se obtuvieron adecuadas características sensoriales y elevada viabilidad. Por otro lado, los cultivos probióticos pueden ser adicionados en productos a base de leche de soja destinados a vegetarianos o personas que presentan alergia a la leche de vaca. En Europa se comercializa una leche de soja conteniendo cultivos probióticos denominada Alpro. Adicionalmente, la incorporación de probióticos a preparaciones deshidratadas se usa para formulaciones infantiles. Además, existen preparaciones farmacéuticas conteniendo bacterias probióticas (bifidobacterias solas o en combinación con lactobacilos) (Kearney y col., 2008).



Figura 6. Alimentos funcionales no-lácteos.

En la Tabla 1 se presentan algunos alimentos funcionales disponibles comercialmente.

Tabla 1. Alimentos lácteos funcionales presentes en el mercado.

		Microorganismo probiótico	Prebióticos
Leche	Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	Actimel	<i>Lactobacillus casei</i> defensis DN114001	
	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota YIT9018	
Leche fermentada	Activia	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN173010	Fructooligosacáridos (FOS)
	Yogurísimo	<i>Lactobacillus casei</i> Bifidobacterias	Biopuritas
	Ser	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN173010	Biopuritas
	Sancor bio	<i>Lactobacillus casei</i> Sancor CRL431	Fructanos naturales (Inulina-FOS)
		<i>Lactobacillus acidophilus</i> Sancor CRL730	
	Lactis	<i>Lactobacillus casei</i>	
Quesos	Bioqueso (Argentina)	<i>Lactobacillus casei</i>	
		<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	
	Cottage (Alemania)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>	
Helados	Göd Halsá	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	

7. *Lactobacillus plantarum* en la industria fermentativa

Lb. plantarum es una especie bacteriana que se encuentra en una amplia variedad de matrices alimentarias, actuando como cultivo iniciador en productos cárnicos, lácteos y vegetales. Si bien mayoritariamente es utilizado en fermentaciones vegetales (aceitunas, chucrut, pepino, masas fermentadas, etc.) también puede ser adicionado como cultivo adjunto acompañando a otros microorganismos en diferentes tipos de quesos y leches fermentadas (Carminati y col., 2010). Sin embargo, debido a su elevada tolerancia a bajos pH (inferior a 4), en la mayoría de los casos, es encontrada formando parte de la microflora dominante NSLAB en diversos alimentos fermentados (Molin, 2008).

Lb. plantarum es una bacteria mesófila pero que puede crecer aún a temperaturas de entre 10 y 15°C, aunque no a 45°C. Son heterofermentantes facultativas, poseen habilidad para fermentar diferentes carbohidratos, incluso pueden fermentar el almidón, y producen

ambos isómeros de ácido láctico. Sin bien, al igual que el resto de las bacterias lácticas son catalasa (-), bajo ciertas condiciones algunas cepas pueden resultar catalasa (+) (Molin, 2008; Corsetti y Valmorri, 2011).

Su pared celular contiene ácidos teicoicos de ribitol o glicerol aunque algunas cepas contienen ácidos teicoicos poco comunes (Corsetti y Valmorri, 2011). Presentan peptidoglicanos de pared celular del tipo m-diaminopimélico, el cual no es el más común entre los lactobacilos (Molin, 2008). En particular, la cepa ATCC 8014 posee ácido teicoico de ribitol con glucosa como sustituyente. También presenta polisacáridos fosforilados que contienen ramnosa (azúcar mayoritario), glucosa, glucosamina y galactosa. Sin embargo, en otras cepas de *Lb. plantarum* el polisacárido de pared no está presente (Douglas y Wolin, 1971).

El tamaño del genoma de *Lb. plantarum* así como también el contenido de GC (variable entre 44 y 46%) es superior en comparación al de otras bacterias lácticas (Molin, 2008; Azcarate-Peril y Klaenhammer, 2010). En particular, la cepa WCSF1 contiene un cromosoma circular simple de 3308274 bp, el cual puede ser considerado uno de los genomas más grandes entre las BAL, dos plásmidos crípticos pequeños de 1917 bp y 2365 bp y un plásmido grande de 36069 bp que codifica para genes involucrados en la transferencia conjugativa de plásmidos. El contenido de GC del cromosoma de esta cepa es de 44,5% mientras que los plásmidos mostraron una concentración desde 34,3 a 40,8 % (Corsetti y Valmorri, 2011).

Además de formar parte de la microflora de alimentos fermentados, esta especie bacteriana es habitante natural del TGI humano y de algunos animales. Por lo tanto, puede cambiar su hábitat desde el TGI de humanos o animales, hasta vegetales y alimentos fermentados. Esto requiere adaptabilidad y competitividad de los microorganismos y podría ser una razón que explique el gran tamaño de su genoma y su capacidad para utilizar diferentes carbohidratos (Molin, 2008).

Debido a su capacidad de utilización de diversos sustratos y a su actividad enzimática, *Lb. plantarum* podría contribuir de manera positiva en la calidad global de productos lácteos. Si bien durante la fermentación de la leche, la lactosa es consumida rápidamente, algunas cepas de esta especie bacteriana pueden utilizar sustratos residuales como lactato, citrato y piruvato. En particular, y como se mencionó anteriormente, el citrato es el precursor de importantes compuestos de flavor que además de afectar el sabor del producto, presentan actividad antimicrobiana (Molin, 2008; Corsetti y Valmorri, 2011).

En condiciones de anaerobiosis, *Lb. plantarum* genera ácido láctico y en condiciones aerobias, ácido acético. También puede utilizar otros ácidos orgánicos (málico, tartárico, cítrico) para producir ácido acético, láctico y dióxido de carbono así como también otros bioproductos (Molin, 2008).

Diversos estudios reportaron que la actividad proteolítica de *Lb. plantarum* es cepa dependiente, aunque en general es menor en comparación a la de otras BAL. Adicionalmente, ciertas cepas evidenciaron actividades de peptidasas, esterasas, lipasas, y la capacidad de catabolizar aminoácidos aromáticos o de cadenas ramificadas, generando compuestos de aroma (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Corsetti y Valmorri, 2011; De Angelis y Gobbetti, 2011).

Además de ácidos orgánicos como el ácido láctico, *Lb. plantarum* puede producir compuestos con actividad antifúngica así como también bacteriocinas. En particular, las bacteriocinas generadas por esta especie bacteriana reciben el nombre de plantaricinas y forman parte de los grupos I y II. La producción de plantaricinas es dependiente del pH y de la temperatura, obteniéndose la máxima producción a pH neutro e incubando la cepa a 30°C. Las cepas de *Lb. plantarum* productoras de bacteriocinas fueron aisladas de diferentes matrices: vegetales, animales, cereales, sourdough, vino y productos lácteos. En particular, las plantaricinas C (clase I), TF711 y pediocina PA1 (AcH, clase IIa) son ejemplos de bacteriocinas aisladas de productos lácteos (Collins y col., 2010; Corsetti y Valmorri, 2011; Devi y Halami, 2011). Cuando la pediocina PA1 fue adicionada en quesos permitió la casi completa eliminación de *Listeria monocytogenes*, que se sabe puede estar presente en quesos del tipo Danbo, Limburg, Tilsit y del tipo Cottage (De Angelis y Gobbetti, 2011).

Algunas cepas de *Lb. plantarum* son productoras de EPS, los cuales son generados generalmente durante la fase exponencial y alcanzan su máximo a comienzos de la fase estacionaria. En algunos casos se puede producir más de un tipo de EPS, los cuales se diferencian en la composición de azúcares o en su peso molecular. En particular, *Lb. plantarum* EP56 produce dos polímeros de $8,5 \times 10^5$ Da y 4×10^4 Da que difieren en el contenido de N-acetil-galactosamina y ramnosa, respectivamente. La temperatura de incubación de la cepa así como también la fuente de carbono utilizada influyen en la producción de EPS. Con respecto a la fuente de carbono, se encontró que la glucosa, galactosa, fructosa, lactosa y sucrosa son los azúcares más eficientes para la producción de EPS (Corsetti y Valmorri, 2011).

8. *Lactobacillus plantarum* como microflora NSLAB en productos lácteos

Como se mencionó anteriormente, *Lb. plantarum* es frecuentemente aislado de productos lácteos donde se encuentra generalmente formando parte de la microflora NSLAB. El recuento de esta especie es elevado durante la primera etapa de la maduración de los quesos (desde 1 semana a 3-4 meses), alcanzando valores superiores a 10^7 UFC/g, aunque los mismos disminuyen a 10^4 UFC/g cuando el tiempo se prolonga (6-7 meses) y otras especies de *Lactobacillus* se convierten en la población dominante. La velocidad de crecimiento y la concentración bacteriana final de esta especie son afectadas por diversos factores (pH, sal, humedad de la cuajada y temperatura de maduración). La presencia de *Lb. plantarum* fue documentada en diversos productos lácteos como leches fermentadas y quesos, elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada de vaca, oveja y de cabra. En estos productos, contribuyó con el desarrollo de adecuadas características organolépticas. Algunos ejemplos de alimentos lácteos conteniendo a *Lb. plantarum* como parte de la microflora NSLAB son: quesos Pecorino, Gorgonzola y Fiore Sardo (Italia), Stilton (Inglaterra), Manchego y Roncal (España), Picant (Portugal), Cheddar (Irlanda, Nueva Zelanda), Qula (El Tibet), Teleme y Feta (Grecia), Cotija y doble crema (México), leche fermentada de Kenia, de Himalaya, leche de camello de Marruecos y productos fermentados de Mongolia. Además, se encontraron cepas de *Lb. plantarum* en quesos Ardua, Caciocavallo Pugliese, Camembert, Canestrato Pugliese, Fontina, Fossa, Kefalotyri, Mahón, Manchego, Mozzarella, Pecorino Toscano y Serra de Estrela. En particular, algunas cepas aisladas de estos productos lácteos evidenciaron adecuadas propiedades tecnológicas y una buena *performance* cuando fueron agregados como cultivos adjuntos en ciertos quesos (Jordan y Cogan, 1999; Ercolini y col., 2003; Manolopoulou y col., 2003; Duan y col., 2008; Mangia y col., 2008; Rantsiou y col., 2008; Nieto-Arribas y col., 2009; Corsetti y Valmorri, 2011; De Angelis y Gobbetti, 2011; Morales y col., 2011; Yu y col., 2011).

9. *Lactobacillus plantarum* como cultivo probiótico

Lb. plantarum es una bacteria robusta capaz de sobrevivir al pasaje a través del TGI, puede alcanzar altos recuentos en el íleon y es detectada en el colon (Kearney y col., 2008; Molin, 2008). En particular, varios autores han reportado que las cepas de *Lb. plantarum* son capaces de tolerar la acidez y la bilis (Cebeci y Gürakan, 2003; Maragkoudakis y col., 2006; Vizoso Pinto y col., 2006; Mathara y col., 2008; Gaudana y col., 2010; Guo y col., 2011; Zago y col., 2011). Esto puede explicarse debido a que cuando se secuenció una cepa de esta especie bacteriana se observó la presencia de genes que codifican para proteínas que cumplen

un rol importante en la resistencia a bilis, detectándose además 31 genes inducidos por la presencia de este compuesto (Kearney y col., 2008).

Varios autores reportaron efectos probióticos para diversas cepas de esta especie bacteriana (de Vries y col., 2006; Cammarota y col., 2009; Franz y col., 2011), sugiriéndose que su uso como cultivo probiótico podría ser ventajoso por sobre otras bacterias lácticas debido a sus aptitudes tecnológicas y a su elevada resistencia en el TGI (Corsetti y Valmorri, 2011).

Entre las propiedades probióticas reportadas, se puede destacar la estimulación del sistema inmunológico (Paolillo y col., 2009; Son y col., 2009; Gaudana y col., 2010; Zago y col., 2011). Además, se han encontrado cepas con actividad de β -galactosidasa (Cebeci y Gürakan, 2003; Vizoso Pinto y col., 2006; Zago y col., 2011), otras que controlan el desarrollo de alergias (Maragkoudakis y col., 2006) y disminuyen el colesterol (Nguyen y col., 2007; Guo y col., 2011). En este caso, la cepa PH04, administrada a ratones hipercolesterolémicos, logró la disminución del colesterol sérico y triglicéridos (Nguyen y col., 2007; Corsetti y Valmorri, 2011).

Adicionalmente, algunas cepas demostraron actividad antimicrobiana (Maragkoudakis y col., 2006; Vizoso Pinto y col., 2006; Fayol-Messaoudi y col., 2007; Gaudana y col., 2010). En particular, la cepa ACA-DC 146, aislada de salmuera de queso Feta, inhibió la adhesión de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* a células Caco-2 (Maragkoudakis y col., 2006). Por otro lado, la cepa ACA-DC287 (aislada de queso griego) disminuyó los recuentos de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en ratones infectados con este patógeno (Fayol-Messaoudi y col., 2007). Lash y col. (2005) reportaron que la actividad antimicrobiana de la cepa ATCC 8014 es, posiblemente, debida a una bacteriocina de 122 kDa. Esta bacteriocina pierde su actividad a temperaturas superiores a 30°C y a valores de pH inferiores a 4 o superiores a 5.

Otro parámetro de interés al momento de seleccionar cultivos probióticos, es la adhesión de los microorganismos a la mucosa intestinal. Esta capacidad fue demostrada para *Lb. plantarum* (Fayol-Messaoudi y col., 2007; Kearney y col., 2008; Mathara y col., 2008; Molin, 2008; Gaudana y col., 2010). Con respecto a esta propiedad, la cepa L2 fue capaz de adherir a células Caco-2 o IEC-6 y además colonizar el TGI de ratones alimentados con dicha cepa (Wang y col., 2009). Los mismos resultados fueron reportados para la cepa DSMZ 12028 (Cammarota y col., 2009).

Además, ciertas cepas de *Lb. plantarum* fueron capaces de fermentar FOSs (fructooligosacáridos), los cuales son reconocidos como prebióticos y por lo tanto

estimularían el desarrollo de los cultivos probióticos (Cebeci y Gürakan, 2003; Corsetti y Valmorri, 2011).

Sin embargo, varios estudios demostraron que *Lb. plantarum* fue resistente a diversos antibióticos. Algunos autores consideran que ésta es una ventaja debido a que la viabilidad de los microorganismos no sería afectada cuando son administrados a pacientes sometidos a terapias con antibióticos. Contrariamente, otros autores consideran a esta propiedad como no deseable debido a que podría existir una transferencia de los genes de resistencia a antibióticos a otros microorganismos, como por ejemplo bacterias patógenas (Cebeci y Gürakan, 2003; Nguyen y col., 2007; Mathara y col., 2008; Corsetti y Valmorri, 2011).

Hasta el momento y dentro de la especie *Lb. plantarum*, la cepa 299v (DSM 9843)

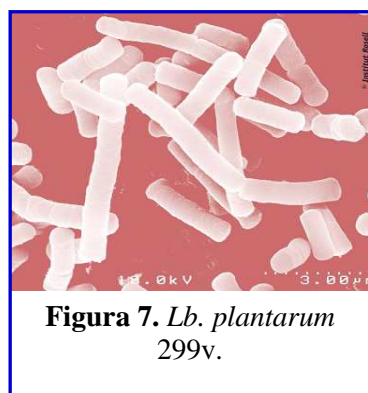


Figura 7. *Lb. plantarum* 299v.

(Figura 7) es una de las más estudiadas en cuanto a sus propiedades probióticas. Esta cepa fue aislada de la mucosa intestinal de humanos en buenas condiciones de salud, posteriormente patentada y comercializada como probiótico desde 1999. Dicha cepa presenta capacidad para unirse a la mucosa intestinal de células en estudios *in vivo* y además, en general, domina el total de la microflora de bacilos de individuos saludables tanto en la mucosa rectal como en la oral.

Además, sobrevive el pasaje a través del TGI y posee actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus faecalis*. Luego de que voluntarios sanos consumieran productos conteniendo la cepa 299v, el nivel de lactobacilos en el intestino aumentó mientras que los recuentos de anaerobios Gram negativos (vinculados con reacciones inflamatorias y producción de sustancias carcinogénicas en el intestino), *Enterobacteriaceae* y clostridios reductores de sulfitos (relacionados con la producción de toxinas y sustancias carcinogénicas en el intestino) disminuyeron (Molin, 2008; Corsetti y Valmorri, 2011).

En particular, la cepa 299v inhibe la adhesión (*in vivo*) de *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica a células epiteliales intestinales y presenta propiedades antagónicas contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y *Helicobacter pylori* (Molin, 2008).

Entre otros efectos benéficos se reportó que el consumo de la cepa 299v atenuó la colitis y disminuyó la severidad de la misma. Luego de la ingesta de esta cepa se produjo un incremento de IgA (Inmunoglobulina A) en el intestino de ratas con enterocolitis (Molin, 2008). Por otro lado, fue capaz de disminuir los factores de riesgo asociados a enfermedades de las arterias coronarias. Específicamente, los niveles de colesterol total, las lipoproteínas de

baja densidad y el fibrinógeno disminuyeron luego del consumo de un jugo de fruta conteniendo esta cepa (Molin, 2008; Corsetti y Valmorri, 2011).

Además, esta cepa resultó segura ya que la traslocación fue muy baja en diversos modelos (pancreatitis, colitis) cuando previamente los animales habían sido tratados con esta cepa, no siendo encontrada en sitios extraintestinales (Molin, 2008).

10. *Lactobacillus plantarum* en productos fermentados

10.1. Productos lácteos

10.1.1. Leches fermentadas

Cuando determinadas cepas de *Lb. plantarum* fueron utilizadas en la elaboración de leche fermentada, mostraron buenas características tecnológicas, y los productos obtenidos presentaron adecuada textura y buenas características sensoriales. Además, las cepas evidenciaron elevada viabilidad durante las condiciones de almacenamiento (Franz y col., 2011).

Kefir

El kefir es una bebida fermentada ácida, algunas veces carbonatada, con bajo



Figura 8. Kefir.

contenido de alcohol, originaria de las montañas caucásicas (Figura 8). Este producto es el resultado de la actividad metabólica de una microflora compleja presente en los gránulos de kefir (Garrote y col., 2010). Los gránulos son inoculados en la leche y la fermentación dura aproximadamente 1 día a temperatura ambiente. Además de la leche, pueden ser utilizados leche de soja o jugos de frutas (Rattray y O'connell, 2011).

Durante la fermentación, los gránulos de kefir aumentan su tamaño y su número y posteriormente son recuperados para futuras fermentaciones (Garrote y col., 2010).

Los gránulos de kefir (Figura 9) están constituidos por proteínas y polisacáridos. Su microflora está integrada por bacterias lácticas, levaduras y bacterias ácidoacéticas coexistiendo en una relación simbiótica, siendo responsables de la fermentación ácido-alcohólica. Sin embargo, la composición de la microflora del gránulo depende de diversos factores como origen, proceso de elaboración, condiciones de cultivo y almacenamiento (Garrote y col., 2010).



Figura 9.
Gránulos de kefir.

En particular, las BAL transforman la lactosa en ácido láctico mientras que las levaduras la convierten en etanol y dióxido de carbono. Por lo tanto, los compuestos generados durante la fermentación son lactato, etanol y dióxido de carbono y en menor cantidad diacetilo, acetaldehído, acetato y aminoácidos libres (Ratray y O'connell, 2011).

Varias propiedades probióticas están asociadas al consumo de kefir y son útiles para el tratamiento de diversas enfermedades como desórdenes gastrointestinales y metabólicos, arterioesclerosis, alergias, problemas cardíacos y tuberculosis. Adicionalmente, presenta efectos antimutagénicos, antitumorales y anticarcinogénicos, anticolesterolémicos, actividad antimicrobiana y antifúngica y produce la estimulación del sistema inmunológico. Además, incrementa la síntesis de ciertas proteínas y disminuye los síntomas de intolerancia a la lactosa (Farnworth y Mainville, 2008; Garrote y col., 2010; Ratray y O'connell, 2011).

En la población microbiana presente tanto en los gránulos de kefir como en el producto final se han encontrado cepas pertenecientes a *Lb. plantarum* (Farnworth y Mainville, 2008; Garrote y col., 2010). A algunas de estas cepas, se le atribuyeron los efectos benéficos asociados con el consumo de kefir. En particular, efecto inhibitorio contra microorganismos patógenos (*Salmonella enterica* serovar Thipymurium, *Salmonella gallinarum*, *E. coli*, y *Shigella sonnei*) debido, en algunos casos, a la producción de bacteriocinas (Garrote y col., 2010).

10.1.2. Quesos

En general, el uso de *Lb. plantarum* como cultivo adjunto en elaboraciones queseras mejoró las características finales del producto. Un ejemplo de ello, es la cepa I91 utilizada en elaboración de quesos Cheddar y Cremoso argentino. En particular, en quesos Cheddar miniatura no contribuyó con la producción de acidez pero afectó la proteólisis secundaria evidenciada por la modificación de los perfiles peptídicos y por el incremento en los niveles de algunos aminoácidos. Además, no se evidenciaron cambios en la composición global de los quesos (Milesi y col., 2008a, 2008b).

Por otro lado, diversas cepas aisladas de fermentos naturales, entre ellas algunas pertenecientes a *Lb. plantarum*, fueron utilizadas como cultivo iniciador en la elaboración de queso Mozzarella de alta humedad. *Lb. plantarum* fue una de las especies que mayor acidez generó durante la elaboración. Además, se obtuvo un producto con atributos sensoriales adecuados y una vida útil mayor a la obtenida mediante la elaboración tradicional (utilizando *St. thermophilus* como cultivo iniciador) (De Angelis y col., 2008). Por otro lado, *Lb. plantarum* junto con otras especies fue utilizada como cultivo adjunto en la elaboración de

quesos a partir de leche microfiltrada obteniendo productos con flavor aceptable (Awad y col., 2010).

Basyigit Kilic y col. (2009) reportaron el uso de cepas probióticas de *Lb. plantarum*, de origen humano (cepas AB16-65 y AC18-82), y otras cepas de *Lb. fermentum* en la elaboración de quesos en Turquía. Luego de 120 días de maduración la concentración de ambos microorganismos fue elevada (10^7 UFC/g) y no afectaron la calidad del queso. Las propiedades sensoriales y la composición global del queso fueron similares a las obtenidas utilizando cultivos de *L. lactis*.

10.2. Productos vegetales

Lb. plantarum se encuentra comúnmente asociado a vegetales, lo cual puede deberse a que esta especie presenta alto requerimiento de manganeso y los vegetales son ricos en este elemento. Además, le otorgan un efecto protector contra la toxicidad del oxígeno (Molin, 2008).

Lb. plantarum está involucrado en la fermentación espontánea de vegetales junto con otras especies de bacterias lácticas, especialmente de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Tanasupawat y Visessanguan, 2008; Carminati y col., 2010). Cuando esta especie bacteriana se utilizó como cultivo iniciador, acompañada o no de otras especies, la calidad de los productos vegetales se incrementó con respecto a los obtenidos mediante fermentación espontánea (Champagne y col., 2011). Por otro lado, el uso de varias especies, entre ellas *Lb. plantarum*, permitió obtener productos con características más homogéneas en zanahoria, nabo, repollo y remolacha, en comparación al uso de cultivos puros (Mäki, 2004). Adicionalmente, cuando fue utilizado en la fermentación de cebollas, incrementó la concentración de algunos nutrientes con actividad antioxidante (Champagne y col., 2011). Durante la fermentación de leche de soja con la cepa *Lb. plantarum* B4495, se produjo la enzima β -glucosidasa, que hidroliza los glucósidos de isoflavonas a agliconas en niveles elevados, las cuales son más activas biológicamente. Estos compuestos ejercen beneficios al ser humano y previenen enfermedades (Rekha y Vijayalakshmi, 2011).

Por otro lado, *Lb. plantarum* se encuentra como microflora dominante en cacao fermentado, principalmente en los primeros estadios de la fermentación siendo luego reemplazada por otras especies de *Lactobacillus*. Cuando se utilizó como cultivo iniciador, conjuntamente con otras especies de *Lactobacillus* y acompañada de levaduras, en la fermentación de granos de cacao, se obtuvieron productos con características mejoradas (De Vuyst y col., 2010).

Hsieh y col. (2008) reportaron que *Lb. plantarum* fue responsable de la fermentación de un producto chino conocido como Jiang Tsai, el cual es elaborado a base de vegetales secos salados. También, está involucrada en un producto a base de mandioca muy popular en el oeste africano denominado Gari (Prajapati y Nair, 2008).

A continuación se presentan diversos productos alimenticios en donde *Lb. plantarum* crece de manera espontánea, aunque en algunos casos, su empleo como cultivo iniciador aportó resultados positivos.

10.2.1. Chucrut

La fermentación del chucrut involucra un sistema muy complejo de microorganismos y procesos bioquímicos, enzimáticos, químicos y físicos. En una primera etapa, la fermentación es conducida por bacterias aerobias (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*) (Holzapfel y col., 2008). Luego, una vez que el potencial redox se redujo y el pH disminuyó, el proceso continúa por acción de bacterias heterofermentantes como *Leuconostoc*. Posteriormente, el género *Lactobacillus*, en particular *Lb. plantarum*, se convierte en la microflora dominante. Sin embargo, la actividad de las BAL dependerá de la temperatura y de la concentración de NaCl. A bajas temperaturas (5°C), la producción de ácido es menor y es debida principalmente a *Leuconostoc* mientras que a 32°C, la microflora de *Lactobacillus* se hace dominante y la producción de acidez aumenta considerablemente. Por otro lado, la actividad de *Leuconostoc* es más afectada por aumento en la concentración de NaCl en comparación a la actividad de *Lactobacillus* (Mäki, 2004; Holzapfel y col., 2008).

Algunos autores demostraron que durante la fermentación espontánea de chucrut se generan compuestos que presentan actividad protectora y anticarcinogénica. El consumo de 300 g de chucrut inhibe la síntesis de enzimas o la actividad enzimática que median la conversión de compuestos procarcinógenos en carcinógenos y que están involucrados en el cáncer de colon (Mäki, 2004).

En general, *Lb. plantarum* evidenció un adecuado comportamiento al ser usado como cultivo iniciador en la elaboración de chucrut generando un rápido descenso del pH y un mejoramiento de las características organolépticas. Por otro lado, el uso de esta especie bacteriana inhibió la formación de aminas biógenas, principalmente tiramina, putrescina y cadaverina (Mäki, 2004; Holzapfel y col., 2008; Beganovic y col., 2011).

10.2.2. Kimchi

El kimchi es un alimento coreano muy popular a base de repollo y/o rábano aunque también pueden ser utilizados otros vegetales. El producto es fermentado en tiempos relativamente cortos y almacenados a 4°C durante 3 semanas o a 15°C durante 4 días. Los microorganismos responsables de la fermentación natural de este producto son bacterias lácticas y levaduras. La microflora presente produce cambios en el flavor y en la textura de los vegetales (Surh y col., 2008).

El kimchi es una importante fuente de vitaminas y fibras, atribuyéndosele además propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas. Adicionalmente, para este alimento, se reportaron diversos efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor como prevención de cáncer colorrectal, diabetes, arterioesclerosis, alta presión sanguínea y obesidad, así como también disminución de frecuencia de enfermedades cardiovasculares e inhibición de *Helicobacter pylori* (Surh y col., 2008). En particular, una cepa de *Lb. plantarum*, aislada de kimchi, mostró elevada adhesión a células intestinales, actividad antimicrobiana y disminuyó el colesterol y la asimilación del mismo en ensayos *in vitro*. Además, evidenció buenas características biológicas debido a su resistencia al pasaje por el estómago y duodeno (Lee y col., 2011).

10.2.3. Kocho

Este producto, considerado como probiótico, es elaborado a base de un vegetal rico en almidón, en Etiopía. Durante el proceso de fermentación, que puede abarcar desde los 15 días hasta los 6 meses, el producto alcanza un pH de 4,2. En el comienzo de la fermentación, la microflora dominante es *Lc. mesenteroides*, aunque a la semana, los lactobacilos alcanzan un número importante. Luego de 1 mes, los lactobacilos permanecen en elevada concentración mientras que los recuentos de *Leuconostoc* disminuyen. *Lb. plantarum* es la especie dominante en este producto junto con *Weissella minor* y *Pediococcus pentosaceus* (Molin, 2008).

10.2.4. Pepinillos salados

Los pepinillos salados son utilizados en la elaboración de diferentes preparados de pickles en Suecia. Los pepinos son colocados en salmuera y fermentados durante 1 a 2 semanas alcanzando un pH de 3,5 (Molin, 2008). Durante la fermentación espontánea de pepino, ocurre algo similar a lo observado durante la fermentación de chucrut. En una primera etapa, la fermentación es conducida por bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras

que generan un ambiente propicio para el desarrollo de bacterias lácticas. *Leuconostoc* es la primera bacteria láctica que crece pero luego será reemplazada por *Lactobacillus* y *Pediococcus*. *Lb. plantarum* es la especie dominante al final del proceso de fermentación (Mäki, 2004). En este caso, el uso de *Lb. plantarum* como cultivo iniciador, produjo pérdidas de calidad del producto debido al fenómeno de hinchazón causado por acumulación de dióxido de carbono (Mäki, 2004; Molin, 2008).

10.2.5. Aceitunas verdes en salmuera

Para la elaboración de este producto, las aceitunas en salmuera son sometidas a una fermentación ácidoláctica por el término de 14 a 18 días alcanzando un pH de 4. *Lb. plantarum* es normalmente encontrado en alto número al final de la fermentación, pudiendo, en algunos casos coexistir con levaduras. La asociación de *Lb. plantarum* con levaduras puede deberse a que las levaduras ejercen un efecto protector contra el oxígeno y adicionalmente liberan vitamina B que sería utilizada por las cepas de *Lb. plantarum*. Por otro lado, se sabe que las levaduras presentan receptores de manosa y las cepas de *Lb. plantarum* con capacidad de asociarse a ella pueden unirse a su superficie (Molin, 2008; Prajapati y Nair, 2008).

En general, cuando esta especie bacteriana fue utilizada como cultivo iniciador, el proceso de fermentación ocurrió a una velocidad superior en comparación a cuando fue conducido de manera espontánea, obteniendo productos con características mejoradas (Hamdi, 2008; Bevilacqua y col., 2010; Perricone y col., 2010).

A este producto también se le atribuyeron propiedades probióticas como la degradación de compuestos fenólicos (presentes en ciertos productos vegetales) por parte de cepas de *Lb. plantarum* (Hamdi, 2008).

10.3. Productos a base de cereales

Algunas matrices no-lácteas como extracto de malta, cebada y trigo influyen de manera positiva en el desarrollo de algunas cepas probióticas de *Lb. plantarum* bajo condiciones de acidez. Esto posiblemente se debe a la elevada concentración de azúcares presente en los cereales (Drake y Drake, 2011; Franz y col., 2011).

Lb. plantarum participa en la fermentación de diversos alimentos africanos a base de maíz denominados mageu, uji y kishk. El mageu es una bebida a base de maíz mientras que el uji es una bebida ácida que contiene harina de maíz y mijo aunque también puede contener

sorgo o mandioca. Por otro lado, el kishk es una mezcla de leche fermentada y cereal (Salovaara, 2004).

10.3.1. Sourdough

El sourdough contiene una mezcla de bacterias lácticas y levaduras en donde *Lb. plantarum* constituye la microflora predominante. Durante el proceso de fermentación se generan ciertos compuestos con actividad protectora que prolongan la vida útil del producto e incrementan la disponibilidad de minerales por aumento de la hidrólisis del ácido fítico. Este ácido puede ser hidrolizado por la microflora o bien por las enzimas fitasas presentes en los cereales, las cuales son activadas por los bajos valores de pH alcanzados durante la fermentación. *Lb. plantarum* es una de la especies responsables de estos efectos (Salovaara, 2004; Molin, 2008; Gerez y col., 2010; Corsetti y Valmorri, 2011). En particular, *Lb. plantarum* junto con otras especies bacterianas fueron útiles en la hidrólisis de gliadina durante la fermentación de sourdough, y el producto resultante fue tolerado por pacientes con enfermedad celíaca (Corsetti y Valmorri, 2011).

Por otro lado, ciertas cepas de *Lb. plantarum* aisladas de sourdoughs y utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración de pan, evidenciaron actividad antifúngica debido a la acidez generada o por la producción de compuestos que mantuvieron su actividad aún luego del calentamiento, prolongando de esta manera la vida útil del producto (Font de Valdez y col., 2010; Gerez y col., 2010).

10.3.2. Ogi

Es un producto fermentado tradicional de Nigeria, a base de cereal que se puede elaborar a partir de maíz, sorgo o mijo. El proceso de fermentación dura aproximadamente 6 días, siendo *Lb. plantarum* la especie bacteriana dominante de la microflora. Adicionalmente, el agregado de *Lb. plantarum* como cultivo iniciador, permite la obtención de productos con alta calidad (Molin, 2008).

Los taninos, presentes en algunos cereales, pueden generar problemas en el producto debido a que reaccionan con proteínas que luego serían no digeribles en el intestino, siendo además los responsables del sabor amargo y astringente de algunos vegetales. Ciertas cepas de *Lb. plantarum* presentan actividad tanasa a través de la cual hidrolizan taninos, eliminando los problemas mencionados y generando ácidos fenólicos que presentan fuerte actividad antifúngica. Además, los taninos pueden contener flavonoides que conjuntamente con los compuestos fenólicos presentan fuerte actividad antioxidante (Molin, 2008).

10.3.3. Togwa

Es una bebida que contiene cereal fermentado mediante BAL y comúnmente se elabora a partir de maíz, sorgo o mijo, en Tanzania. En algunas zonas, se utiliza harina de arroz o mandioca, o una mezcla de cereales y mandioca. El producto es fermentado durante 9 a 24 hs, obteniendo un pH final de 3,2 a 4 y altos niveles de *Lb. plantarum* (Molin, 2008).

En general, el togwa se elabora en condiciones no higiénicas y es por ello que suele contener elevadas concentraciones de enteropatógenos. Sin embargo, cuando ciertas cepas de *Lb. plantarum* fueron inoculadas al producto, los microorganismos contaminantes desaparecieron luego de las 24 hs debido al bajo pH alcanzado durante la fermentación (Molin, 2008).

Para este producto, se han encontrado ciertas propiedades benéficas como la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de enterotoxinas y el mejoramiento de la condición de la mucosa intestinal en personas con diarrea. Adicionalmente, el togwa puede provocar la disminución de enteropatógenos en heces de infantes. En particular, este fenómeno se evidenció cuando la cepa 299v fue utilizada como cultivo iniciador en su elaboración (Salovaara, 2004; Molin, 2008).

10.3.4. ProViva



Figura 10. Alimentos funcionales conteniendo cepas de *Lb. plantarum*.

ProViva es una bebida frutal probiótica comercializada en Finlandia, Dinamarca, Suecia y Reino Unido (Figura 10). En Alemania, es comercializada bajo el nombre de PrimaVita y en Bélgica como ProVie. Este producto contiene harina de avena fermentada con *Lb. plantarum* 299v (DSM 9843) (Molin, 2008). La avena fermentada es mezclada (5%) con diferentes tipos de jugos de fruta como frutillas, arándanos, pasas de uvas y frutas tropicales.

En el producto final, la cepa 299v alcanza recuentos de 5×10^7 UFC/ml aproximadamente.

Por otro lado, la misma materia prima es utilizada en la elaboración de un helado probiótico con bajo contenido de grasa, denominado God Hälsa. En este producto, la concentración de la cepa 299v es superior ya que la avena es agregada en un porcentaje mayor (20%) (Molin, 2008).

Diversos estudios reportaron que la cepa 299v, administrada en la bebida ProViva, tiene capacidad para sobrevivir el pasaje a través del TGI y establecerse por un corto período de tiempo en el intestino. Entre los efectos asociados al consumo de ProViva, se pueden mencionar la estimulación del sistema inmunológico, disminución de los niveles de fibrinógeno y otros marcadores inflamatorios, así como también de los síntomas del síndrome del colon irritable (Molin, 2008).

10.4. Productos cárnicos

Lb. plantarum junto con otras especies de *Lactobacillus* son comúnmente encontradas en embutidos fermentados. Sin embargo, la frecuencia de aislamiento de *Lb. plantarum* es menor en comparación con *Lactobacillus sakei* y *Lb. curvatus*. Estos microorganismos se encuentran de manera natural en productos cárnicos, provenientes posiblemente de la materia prima o bien de los materiales empleados durante su elaboración (Vignolo y col., 2010).

A través de estudios moleculares se detectaron cepas de *Lb. plantarum* en salame (Salame Friulano), siendo además responsable de la fuerte actividad acidificante en embutidos argentinos y productos españoles fermentados como jamón cocido, morcilla y fiambre magro adobado (Vignolo y col., 2010). Una de las funciones que cumple *Lb. plantarum* durante la fermentación de embutidos es contribuir con la acumulación de glutamato debido a la proteólisis y a la deaminación de la glutamina llevada a cabo por la enzima glutamino deaminasa presente en esta especie bacteriana. El glutamato es uno de los responsables del sabor en alimentos y por lo tanto esta actividad es importante tanto durante la fermentación como en la maduración de embutidos (Hammes y col., 2008).

En ciertos alimentos cárnicos se utilizaron cepas de *Lb. plantarum* como cultivo iniciador, obteniéndose productos con características mejoradas (Essid y col., 2009; Moore y Kailasapathy, 2011). Tal es el caso de la elaboración de salame y de Nham, un alimento tailandés a base de carne de cerdo fermentado (Tanasupawat y Visessanguan, 2008; Bedia y col., 2011). En este caso, algunas cepas de *Lb. plantarum* sensibles a ácido, fueron ensayadas satisfactoriamente de acuerdo a su capacidad acidificante y tolerancia a acidez con el objetivo de reducir la post-acidificación y prolongar la vida útil de Nham (Jaichumjai y col., 2010).

Con respecto a la resistencia a barreras biológicas, las cepas de *Lb. plantarum* aisladas de productos cárnicos fermentados, presentaron capacidad para sobrevivir a bajos pH (1,5-2,5) y altas concentraciones de bilis (10 mM), hidrolizando además sales biliares (Hammes y col., 2008).

En cuanto a las características probióticas, se observó un efecto protector luego de la administración de *Lb. plantarum* a ratas que habían sido inducidas con enterocolitis (Hammes y col., 2008). Adicionalmente, se observó la producción de bacteriocinas por determinadas cepas de *Lb. plantarum* (Tanasupawat y Visessanguan, 2008; Todorov y col., 2010).

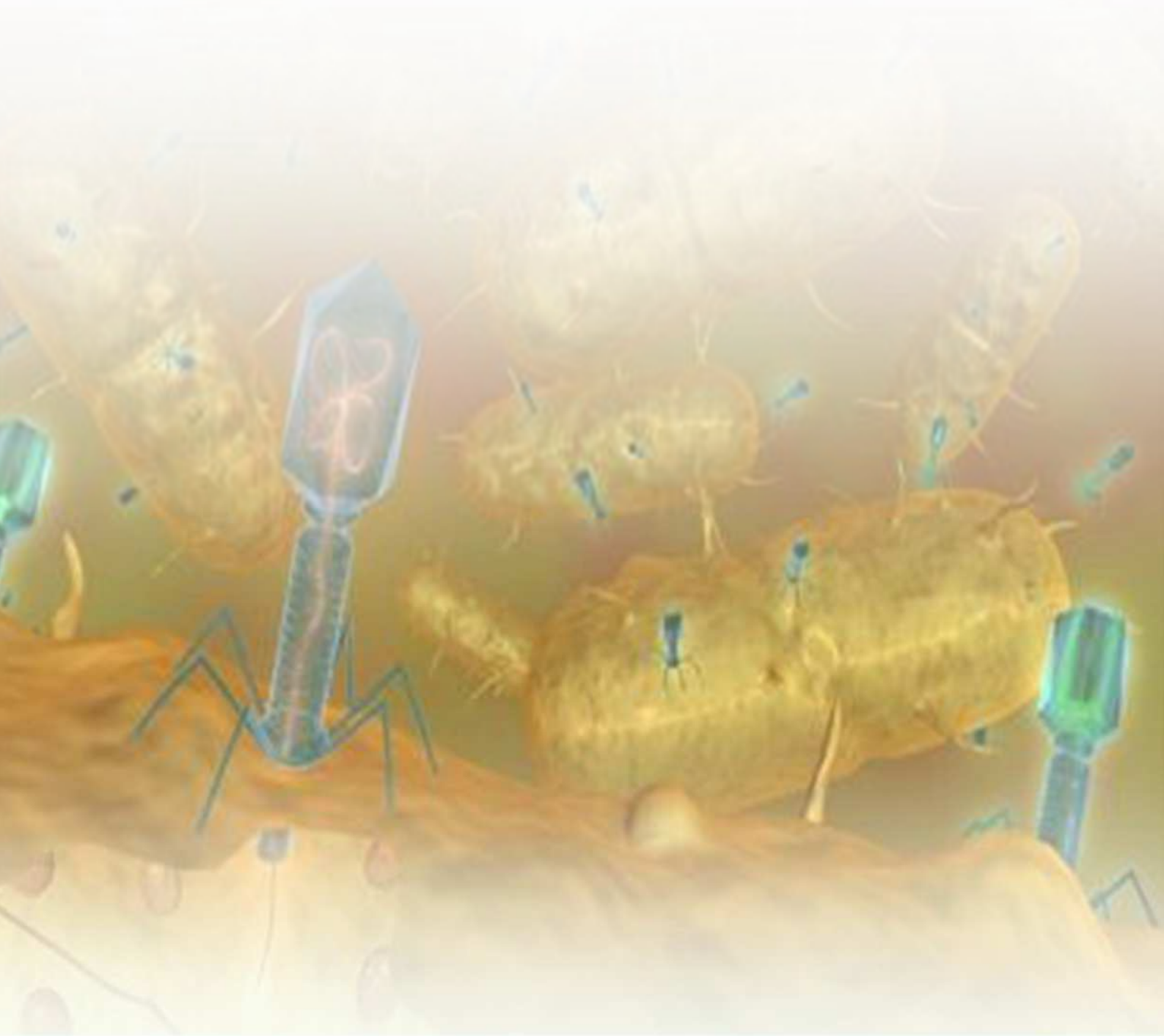
10.5. Productos a base de pescado

Ringo (2004) reportó la presencia de *Lb. plantarum* en la microflora natural de alimentos a base de pescado. Asimismo, esta especie bacteriana también fue aislada de productos tailandeses conteniendo pescado (Tanasupawat y Visessanguan, 2008). Por otro lado, *Lb. plantarum* junto con *Lb. casei* son usados en la fermentación de surimi, un alimento a base de pescado que se consume en Japón. Ambos microorganismos contribuyen de manera positiva con el desarrollo de propiedades tecnológicas de interés en el alimento (Vendramini y col., 2011).

Por otro lado, se han encontrado cepas de *Lb. plantarum* productoras de bacteriocinas en alimentos a base de pescado, tal es el caso del producto tailandés denominado som-fak (Tanasupawat y Visessanguan, 2008).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, Lb. plantarum podría ser destinado para el desarrollo de diversos alimentos funcionales, debido a las características probióticas evidenciadas para algunas de sus cepas así como también por su capacidad para desarrollar en diferentes matrices, mejorando las propiedades organolépticas de las mismas. Sin embargo, esto implica que las cepas posean elevada resistencia fágica para poder llevar a cabo sus funciones de manera exitosa. Por ello, resulta interesante desarrollar estudios relacionados a las infecciones fágicas sobre esta especie bacteriana.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar conocimientos científicos sobre la naturaleza de las infecciones fágicas en *Lactobacillus plantarum*.

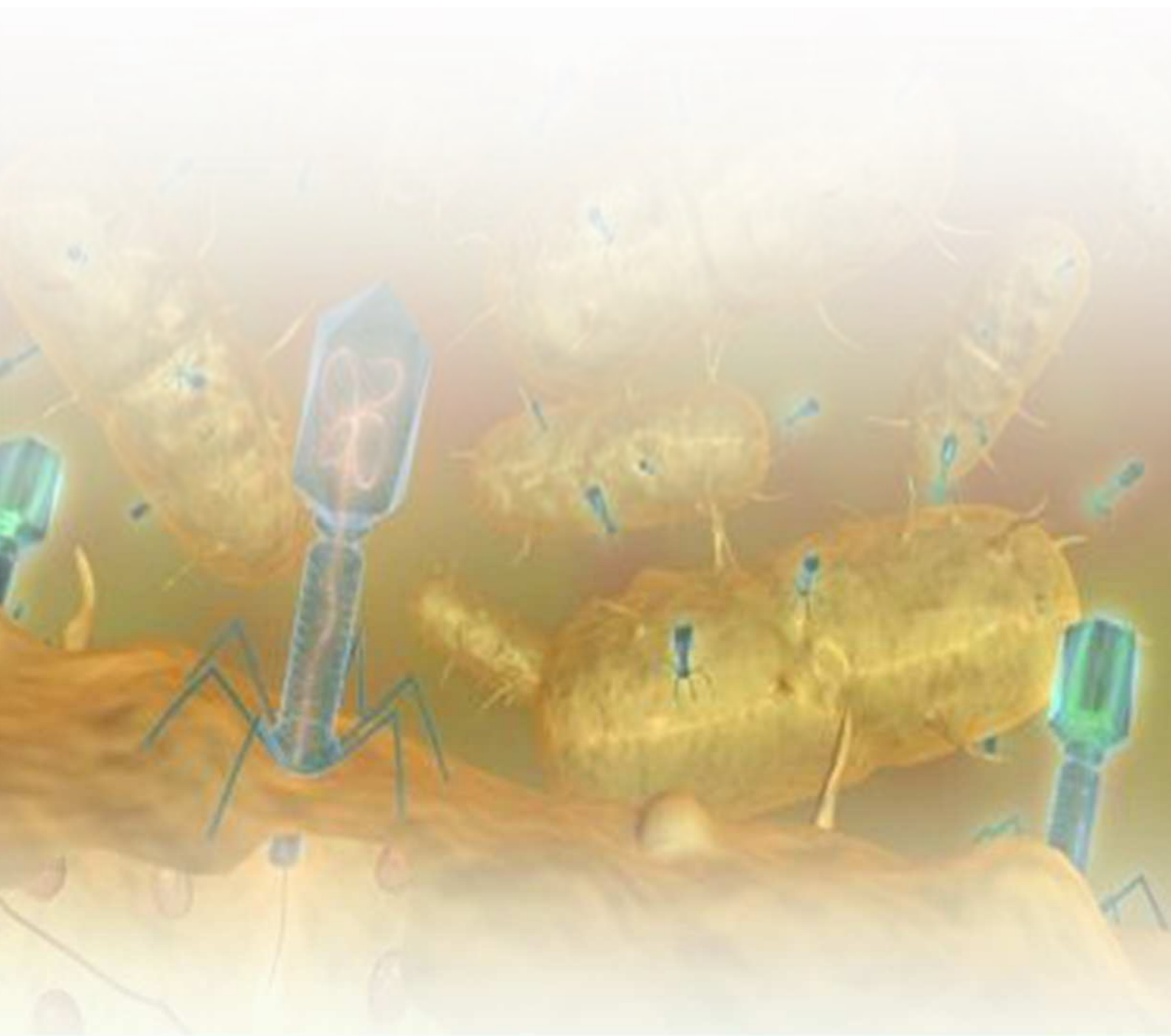
Objetivos particulares

- ❖ Caracterizar desde un punto de vista morfológico, químico y genético, fagos específicos de *Lb. plantarum*.
- ❖ Caracterizar la interacción de estos fagos con sus cepas sensibles, con especial atención a la influencia de factores ambientales y fisiológicos, con el fin de establecer condiciones que puedan disminuir el riesgo de infecciones.
- ❖ Identificar los receptores fágicos.
- ❖ Estudiar la resistencia de fagos de *Lb. plantarum* frente a tratamientos térmicos, químicos.
- ❖ Estudiar la resistencia de fagos de diversas especies de bacterias lácticas frente a tratamientos fotocatalíticos.
- ❖ Obtener y caracterizar (desde el punto de vista genético, fenotípico y tecnológico) mutantes espontáneos fago resistentes a partir de cepas sensibles de *Lb. plantarum*.

Capítulo I

Infecciones fágicas en *Lactobacillus plantarum*

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Los bacteriofagos en la industria láctea fermentativa

Los bacteriofagos (o fagos) son los virus que infectan bacterias. Ellos se propagan a expensas de sus cepas sensibles, utilizando la maquinaria biosintética de la célula. Por ello, cualquier sustrato en el cual ha habido desarrollo bacteriano puede ser considerado como fuente potencial de fagos (Guttman y col., 2005).

La presencia de fagos es uno de los problemas más importantes que enfrentan los procesos fermentativos debido a que pueden causar la lisis celular del cultivo iniciador, produciendo un retardo o bloqueo en la fermentación, alteración de la calidad del producto y, en casos severos, la pérdida total del producto. Como consecuencia de esto se pueden generar grandes pérdidas económicas (Guttman y col., 2005; Rodríguez González y col., 2010).

El problema es aún más grave cuando las infecciones fágicas recaen sobre cultivos probióticos. Por un lado, el producto no desarrollará sus funciones probióticas en el huésped. Por otro lado, las pérdidas económicas son mayores ya que el agregado de bacterias probióticas a productos lácteos implica costos elevados y una gran inversión en investigación y desarrollo para avalar las propiedades probióticas de la cepa y del producto al cual es agregada (Capra, 2007).

Los fagos que infectan bacterias lácticas han sido aislados de diversas matrices alimentarias (leche cruda, yogur, queso, vegetales, cereales, vinos, café) así como también de aguas residuales, saliva y vagina (Rodríguez Gonzáles y col., 2010). Sin embargo, una de las industrias más afectadas por las infecciones fágicas, es la industria láctea fermentativa. En general, el proceso de fermentación ya se ve comprometido cuando la concentración de partículas fágicas es de aproximadamente 10^4 UFP/ml, aunque esto dependerá de cada planta industrial en particular. Cuando la concentración fágica alcanza valores superiores a éste, el proceso de fermentación puede no ser llevado a cabo y por lo tanto el producto presentará ausencia parcial o total de las características de interés. Si esto ocurre, el ambiente de elaboración debe ser sometido a una cuidadosa limpieza para eliminar la mayor cantidad de partículas fágicas y evitar su diseminación (Moineau y Lévesque, 2005).

Los fagos pertenecientes a *Lactococcus* y a *St. thermophilus* son los mayormente aislados entre los fagos de bacterias lácticas, debido a que estas especies bacterianas son las más utilizadas en los procesos fermentativos industriales. Por lo tanto, estos fagos han sido caracterizados en detalle. Sin embargo, también se han aislado fagos de diferentes ambientes, que infectan a *Leuconostoc* (Josephsen y Neve, 2004; Atamer y col., 2011) y a diversas

especies de *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. helveticus*) (Josephsen y Neve, 2004; Quiberoni y col., 2011).

Hoy se sabe que la principal fuente de entrada de fagos a los ambientes lácteos, es la leche cruda. Ellos pueden propagarse rápidamente, alcanzando altos niveles en cortos tiempos y así diseminarse por todo el ambiente industrial (Moineau y col., 2002). Además, el uso de cultivos iniciadores conteniendo cepas lisógenas constituye, también, una fuente potencial de fagos. Por ello, las cepas lisógenas no deberían ser incluidas en los fermentos ya que si bien, podrían proteger a la cepa de ataques por parte de fagos relacionados, por otro lado pueden liberar fagos espontáneamente que se multiplicarían si encuentran una cepa sensible (Brüssow y Kutter, 2005; Moineau y Lévesque, 2005; Garneau y Moineau, 2011).

En la industria láctea se plantean dos escenarios diferentes en cuanto a la frecuencia de infecciones fágicas: las elaboraciones queseras y de leches fermentadas (Brüssow y Kutter, 2005).

En la industria de leches fermentadas, la materia prima es sometida a un tratamiento térmico de 90°C, el cual, en general, elimina las partículas fágicas. Además, este proceso es relativamente aséptico ya que el producto fermentado raramente es expuesto al medio ambiente (Figura 11). En cambio, en la industria quesera, se utiliza leche cruda o pasteurizada. Ambas son fuentes de fagos ya que los procesos de pasteurización, en general, no son efectivos en la inactivación fágica. Por otro lado, durante la separación del suero de quesería se generan bioaerosoles, que pueden diseminar partículas fágicas por todo el ambiente (Figura 12). Estas particularidades hacen que las elaboraciones queseras sean más susceptibles a las infecciones fágicas (Moineau y Lévesque, 2005).



Figura 11. Etapas durante el proceso de elaboración de quesos.



Figura 12. Etapas durante el proceso de elaboración de leches fermentadas.

2. Estructura de los fagos de bacterias lácticas

Los fagos de bacterias lácticas están agrupados bajo el orden *Caudovirales* (fagos con cola). Entre todos los virus conocidos, los fagos con cola son los más numerosos y los que evidencian mayor diversidad en cuanto a sus propiedades (dimensiones, estructura, composición y contenido de ácidos nucleicos, proteínas, rango de hospedadores, fisiología) (Ackermann, 2005).

La composición de las partículas fágicas es muy sencilla ya que están constituidas por ácidos nucleicos y proteínas. El material genético del fago, en general, es ADN lineal de doble cadena y se encuentra contenido en la cabeza, rodeado por una envoltura proteica que lo protege del ambiente. Unida a la cabeza, se encuentra la cola (Moineau y col., 2002; Guttman y col., 2005).

La morfología de la cabeza (o cápside) puede ser isométrica o elongada (prolata) mientras que la cola es un tubo pequeño que puede estar unido a la cabeza a través de un collar y cuya estructura puede ser rígida o flexible. La longitud de la cola es variable y puede poseer un tubo externo más grueso denominado vaina. La placa basal es una estructura compleja adicional que puede o no estar presente y tiene por función el anclaje del fago a la célula huésped, para lo cual puede además presentar fibras (Frank y Hassan, 1998; Ackermann, 2009). En la Figura 13 se muestra una micrografía obtenida a través de microscopía electrónica de barrido y que posteriormente fue coloreada, en donde se evidencia la morfología básica de fagos de bacterias lácticas.

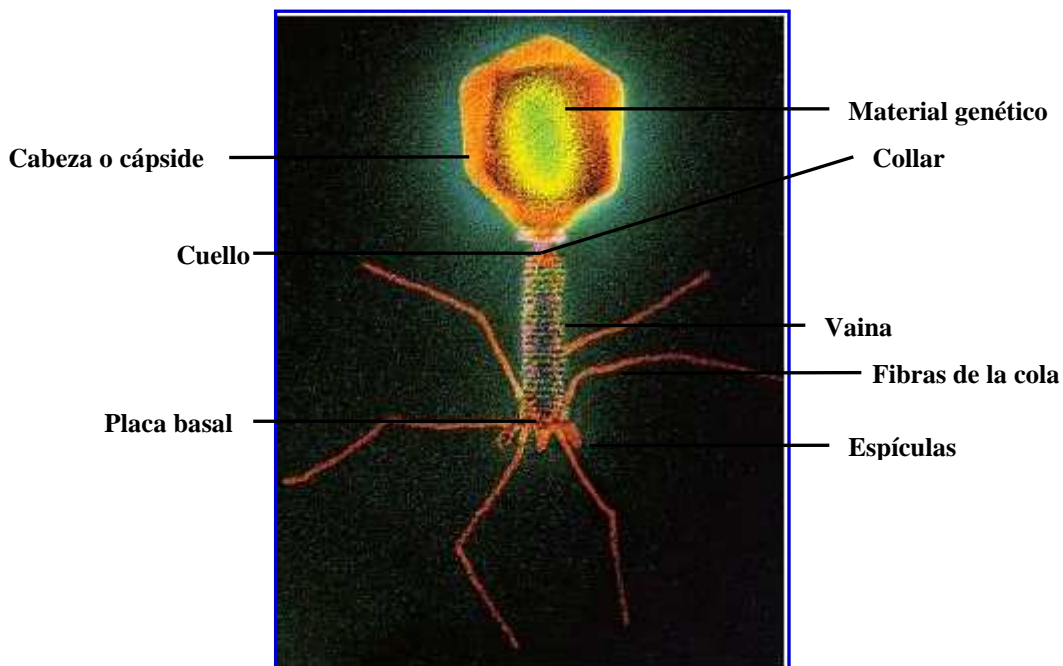


Figura 13. Morfología básica de fagos de bacterias lácticas.

Los fagos de bacterias lácticas pueden agruparse en base a la clasificación propuesta por Ackermann (2009) en las familias (Figura 14):

Myoviridae, poseen colas contráctiles consistentes de un cuello, un tubo central y una vaina.

Siphoviridae, con colas largas y no contráctiles.

Podoviridae, con colas cortas y no contráctiles.

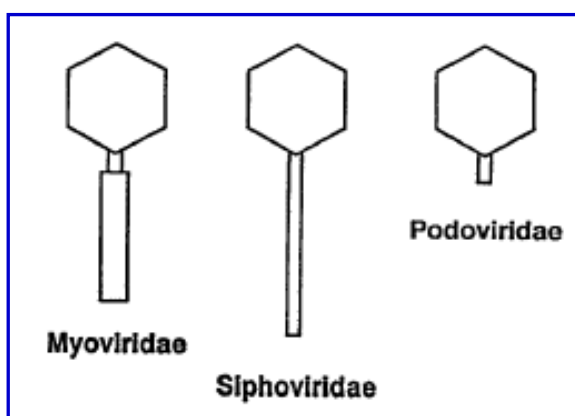


Figura 14. Familias de fagos de bacterias lácticas (Ackermann, 2009).

Teniendo en cuenta esta clasificación, la mayoría de los fagos de BAL pertenecen a la familia *Siphoviridae*. En particular, de 186 fagos de *Lactobacillus* caracterizados morfológicamente, 109 fueron clasificados como *Siphoviridae*, 76 como *Myoviridae* y solamente 1 como *Podoviridae*. Los fagos de *Lactococcus* y *St. thermophilus* pertenecen principalmente a la familia *Siphoviridae* aunque algunos fagos de *Lactococcus* también fueron clasificados como *Podoviridae* (Rodríguez González y col., 2010; Quiberoni y col., 2011).

Adicionalmente, los fagos de bacterias lácticas que forman parte de la familia *Siphoviridae* se pueden clasificar en los grupos Sfi11 y Sfi21, de acuerdo a la organización de los genes y al mecanismo de empaquetamiento del ADN. Los fagos que forman parte del grupo Sfi11 evidencian un mecanismo de empaquetamiento del ADN del tipo *pac* mientras que para los fagos Sfi21, es del tipo *cos*. En cuanto al ordenamiento de los genes, las principales diferencias entre ambos grupos aparecen en aquellos que codifican para proteínas estructurales. Los fagos Sfi11 difieren de los del grupo Sfi21 debido a que poseen dos proteínas mayores de la cápside en lugar de una, las cuales evidencian ausencia de procesamiento proteolítico y además presentan una proteína scaffold. De esta manera, en los genomas de los fagos clasificados como Sfi11 los genes se ordenan de la siguiente manera: proteína portal - proteína menor de la cápside - proteína scaffold - proteína mayor de la cápside. En contraste, el ordenamiento para los fagos Sfi21 es: proteína portal - proteasa - proteína de la cápside (Brüssow y Desiere, 2001; Brüssow y Kutter, 2005).

3. Caracterización de fagos de bacterias lácticas

Debido a los problemas derivados de las infecciones fágicas, existe interés en conocer la fuente a través de la cual los fagos ingresan al ambiente industrial así como también entender sus mecanismos de interacción con las cepas sensibles y proveer soluciones para lograr un exitoso proceso de fermentación (Lyne, 2011). Para ello, los fagos son caracterizados a través de diversos parámetros:

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

Rango de hospedadores: es el perfil de lisis de un bacteriofago particular cuando se enfrenta a una variedad de cepas. Debido a que este rango puede modificarse rápidamente debido a cambios del fago o de la cepa, muchos autores consideran que no son confiables para la caracterización. Sin embargo, resultan de gran utilidad desde el punto de vista tecnológico

ya que conociendo el grupo de cepas sensibles a un determinado bacteriofago, es posible implementar medidas de control adecuadas (Capra, 2007).

Perfil de proteínas: las proteínas estructurales de las partículas fágicas pueden ser separadas en geles desnaturizantes SDS-PAGE. Suelen distinguirse entre dos y cuatro proteínas estructurales mayoritarias, derivadas de cabezas y colas, y un conjunto más o menos grande de proteínas estructurales minoritarias. Los perfiles proteicos obtenidos resultan similares para fagos morfológicamente relacionados (Carlson, 2005).

Serología: consiste en enfrentar las partículas fágicas a antisueros específicos y agruparlas de acuerdo a su capacidad de ser neutralizadas por determinados antisueros (Capra, 2007). Esta técnica se utilizaba anteriormente para la caracterización de fagos, siendo actualmente reemplazada por otras metodologías.

Además, se puede realizar una caracterización genética, la cual puede incluir:

Análisis con enzimas de restricción: los perfiles de restricción, que son específicos de cada bacteriofago, se obtienen mediante el uso de endonucleasas de restricción que reconocen y cortan en sitios específicos el ADN fágico. Luego, los fragmentos pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa (Carlson, 2005).

Mapas de restricción: se pueden construir a través de la restricción del ADN fágico con una variedad de enzimas de restricción y localizando la posición relativa de los sitios de corte en el genoma (Capra, 2007).

Tamaño del genoma: a través de los mapas de restricción genómicos y la estimación combinada a partir de datos obtenidos por microscopía electrónica y tamaños de fragmentos obtenidos por restricción, se puede deducir el tamaño de los genomas. También se puede estimar por adición de los tamaños de los fragmentos de ADN de una digestión con una enzima de restricción particular (aunque este método puede subestimar el tamaño total del genoma). Se puede determinar de una manera más exacta si se conoce la secuencia del genoma (Capra, 2007). El tamaño del genoma es específico para cada fago y varía normalmente entre 35 y 130 kb (Villion y Moineau., 2009). La composición total de nucleótidos del ADN se indica como el porcentaje de pares de bases guanina–citosina que contiene y se denomina abreviadamente como contenido en GC. Este parámetro es específico para cada fago y normalmente refleja el de la cepa hospedadora, evidenciando la coevolución fago/hospedador. El contenido en GC de los fagos de bacterias lácticas varía entre 32% y 51% (Villion y Moineau, 2009; Dupuis y Moineau, 2010).

Mecanismos de empaquetamiento del genoma fágico (*cos/pac*): los fagos se dividen en dos grupos según el empaquetamiento de su ADN genómico, en base a la presencia o

ausencia de extremos cohesivos. El método consiste en comparar los patrones de restricción del ADN viral tratado y sin tratar con ADN ligasa. Si el fago posee extremos cohesivos, aparece un nuevo fragmento en las muestras de ADN ligado al mismo tiempo que desaparecen dos bandas en las muestras no ligadas, siendo la suma de sus tamaños igual al del nuevo fragmento (Capra, 2007). En cambio, la presencia de fragmentos submolares luego del análisis por restricción, evidencia la presencia del sitio *pac* en el cual se inicia el empaquetamiento del genoma (Yoon y col., 2001; Lu y col., 2005).

Los extremos cohesivos consisten en una secuencia de ADN simple hebra, de unos pocos nucleótidos de longitud, que se encuentran en los extremos del ADN viral. Estas hebras son complementarias entre sí y permiten la circularización del ADN. Para estos fagos el empaquetamiento comienza en un sitio *cos* y continúa hacia el siguiente sitio *cos*, donde el ADN es cortado por una nucleasa específica codificada en el genoma fágico y denominada terminasa. Algunos fagos poseen moléculas de ADN sin extremos cohesivos, con un tamaño superior al necesario para contener el genoma completo del fago. La misma secuencia corta de nucleótidos se repite en uno y otro extremo del genoma, denominándose redundancia terminal. En estos casos, el ADN lineal de distintos fagos, no tiene el mismo inicio ni fin, aún cuando el orden de los genes es el mismo al disponerlos en un mapa físico circular. Para los fagos del tipo *pac*, el empaquetamiento comienza en un sitio *pac* y continúa hasta que la cápside, que inicialmente está vacía, se llene (Yoon y col., 2001; Capra, 2007).

Perfil RAPD: se basa en la amplificación del ADN genómico usando como iniciadores oligonucleótidos cortos de secuencia aleatoria. El resultado es un conjunto de fragmentos de ADN en distinto número y tamaño en función del ADN utilizado como molde, pudiéndose obtener polimorfismos sin necesidad de conocer secuencias de nucleótidos específicas (Capra, 2007).

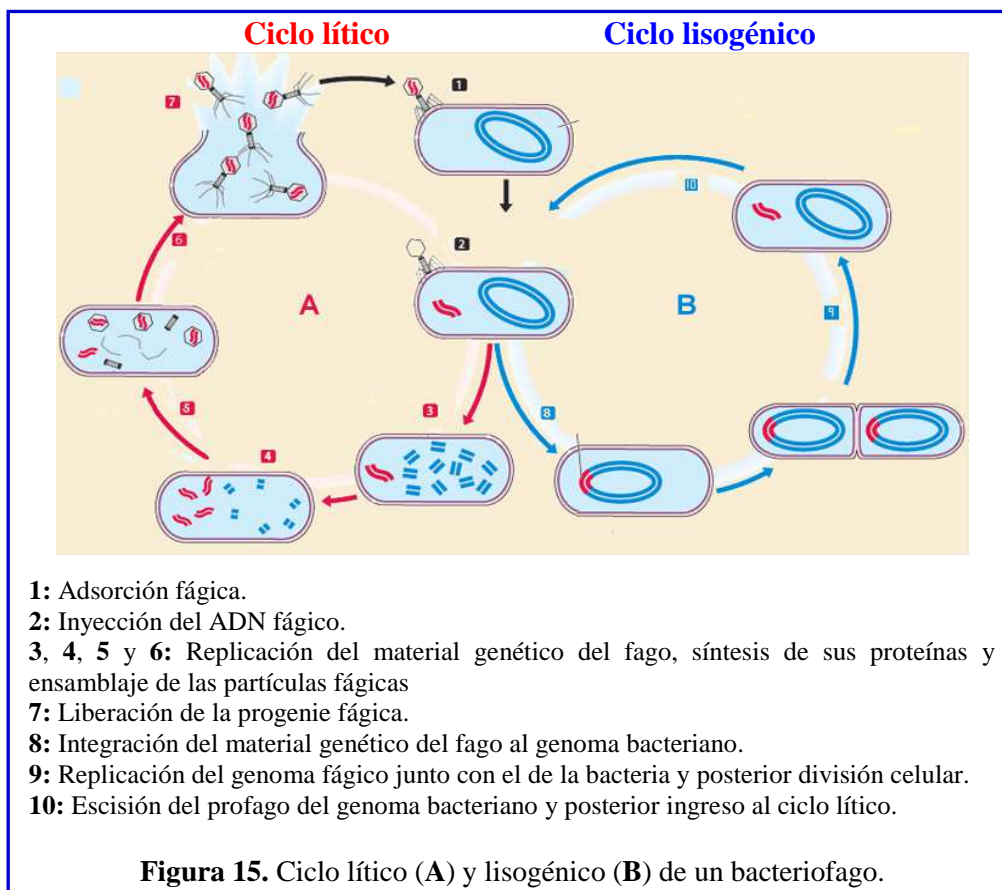
Hibridización ADN-ADN: esta técnica es excelente para determinar la homología de ADN entre bacteriofagos. Las moléculas de ADN doble hebra a comparar se desnaturalizan a ADN simple hebra, luego se mezclan y se permite el reapareamiento de las hebras. A fin de detectar la reacción de hibridación, una de las dos moléculas de ADN se marca radioactivamente o se modifica químicamente (Capra, 2007).

Genes de bacteriofagos: la caracterización y análisis molecular de genes específicos, elementos regulatorios y otras secuencias del genoma fágico, permiten lograr un mejor entendimiento de la organización de los genomas, el control de la expresión génica (tanto en ciclos líticos como en lisogénicos), y el modo por el cual se sintetizan, ensamblan y liberan los viriones (Capra, 2007).

Secuenciación: A través del análisis detallado de las secuencias genéticas y su comparación con las secuencias de otros fagos, se puede obtener información sobre la biología de fagos, evolución fágica, transferencia vertical y horizontal de genes, diversidad genética y ciclos lítico/lisogénico (Lu y col., 2005). El fago LL-H (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) es el primer fago de lactobacilos para el cual se determinó la secuencia nucleotídica completa (Alatossava y col., 1998). Villion y Moineau (2009) reportaron el secuenciamiento del genoma de 9 fagos pertenecientes a *Lactobacillus* (3 de *Lb. plantarum*, 2 de *Lb. casei*, 1 de *Lactobacillus crispatus*, 1 de *Lb. delbrueckii*, 1 de *Lactobacillus gasseri*, 1 de *Lb. rhamnosus*). Adicionalmente, en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) figura la secuencia de 5 fagos infectivos de *Lactobacillus*, entre ellos el fago Sha1 de *Lb. plantarum*. La facilidad relativa con la cual los genomas completos de los bacteriofagos pueden ser elucidados en la actualidad, ha tenido un profundo impacto en el estudio de los mismos.

4. Ciclos de multiplicación fágica

Los fagos pueden multiplicarse, a expensas de la célula bacteriana huésped, a través de dos ciclos: lítico o lisogénico (Figura 15).



En un ciclo lítico, los fagos infectan y lisan la cepa hospedadora con la posterior liberación de la progenie fágica. Estos fagos reciben el nombre de líticos o virulentos. Durante el ciclo de infección lisogénico, el ADN viral se integra al genoma de la bacteria infectada y se replica junto a éste, transmitiéndose de una generación a otra sin que se produzca la lisis celular. En este caso, el fago (fago temperado) adquiere un estado inactivo dentro de la célula, denominado profago (Quiberoni y col., 2011).

4.1. Ciclo lítico

4.1.1. Adsorción

Es el primer paso de la infección y ocurre cuando el fago se adsorbe, de manera específica, sobre receptores fágicos (carbohidratos y proteínas, entre otros) ubicados sobre la superficie celular de una bacteria susceptible (huésped). El reconocimiento del sitio específico de adsorción está mediado por estructuras ubicadas en el extremo de la cola del fago como placa basal, espículas o fibras (Quiberoni y col., 2011).

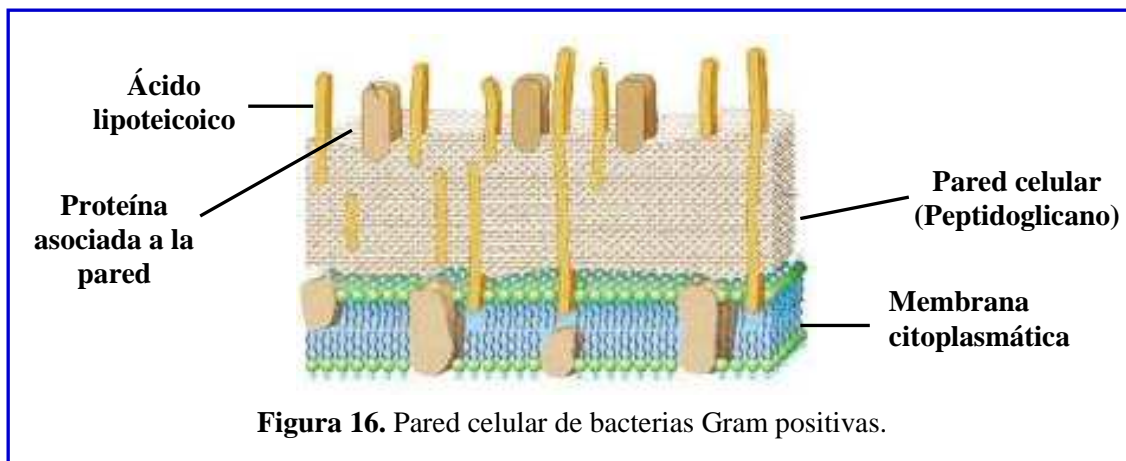
Frecuentemente, la adsorción presenta una primera etapa reversible de unión a los receptores a través de las fibras de la cola y un adecuado posicionamiento de la placa basal. Luego, existe una interacción irreversible entre proteínas de la cola y proteínas localizadas en la membrana celular (Kutter y col., 2005; Quiberoni y col., 2011). En algunos casos, intervienen elementos de reconocimiento del receptor denominados adhesinas. Las adhesinas son altamente específicas y versátiles, capaces de reconocer receptores diferentes sobre diversas bacterias (Kutter y col. 2005).

La velocidad y eficiencia de adsorción varían para cada sistema cepa-fago y dependen de factores externos (temperatura, pH, presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+}) y del estado fisiológico celular (Quiberoni y col., 2011). El estado fisiológico celular puede modificar la concentración de moléculas de la superficie celular utilizadas como receptores y, de esta manera, afectar la eficiencia de infección de ciertos fagos (Guttman y col., 2005).

4.1.1.1. Receptores fágicos en bacterias lácticas

Pared celular de bacterias Gram positivas

En las bacterias Gram positivas, el 90% de la pared celular está constituido por peptidoglicano, cuya estructura es rígida y es la responsable de su resistencia. Además, presenta otros polímeros asociados como polisacáridos, ácidos teicoicos, lipoteicoicos y rodeado, en algunas especies, por una capa de proteínas (S-layer) (Seltmann y Holst, 2002) (Figura 16).



El **Peptidoglicano (PG)** forma una estructura multicapa de 30 nm de espesor, compuesta por dos derivados de carbohidrato, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico. Además, presenta un pequeño grupo de aminoácidos que constan fundamentalmente de L-alanina, D-alanina, D-ácido glutámico y lisina o ácido diaminopimélico (DAP). Sin embargo, el DAP no es común en las bacterias Gram positivas; ellas en su mayoría presentan lisina y raramente otro aminoácido. Estos constituyentes están conectados entre sí para formar una estructura repetitiva, el tetrapéptido glicano. En esta estructura, las cadenas de glicanos formadas por los carbohidratos están conectadas por enlaces peptídicos cruzados formados por los aminoácidos, lo que determina la rigidez de la estructura (Seltmann y Holst, 2002).

Además del PG, la pared celular está formada por **ácidos teicoicos**, los cuales están presentes generalmente en pequeñas cantidades. Los AT incluyen todos los polímeros de la pared, la membrana o capsulares que contienen residuos de fosfato de glicerol o de ribitol. Los ácidos teicoicos son sintetizados en la superficie externa de la membrana citoplasmática y son muy diversos en estructura y abundancia, dependiendo de la cepa o especie, estadio o velocidad de crecimiento, pH del medio, fuente de carbono, etc. (Delcour y col., 1999).

Por otro lado, los ácidos lipoteicoicos pueden permanecer unidos a la membrana citoplasmática gracias a sus anclajes lipídicos, aunque una fracción se encuentra libre en la pared o incluso liberada al medio (Delcour y col., 1999)

Ciertas bacterias poseen estructuras de superficie denominadas **S-layer**. Se trata de un entramado cristalino constituido por proteínas o glicoproteínas. Las subunidades proteicas que lo componen forman cubiertas porosas que recubren totalmente la célula. Al formar parte de la cubierta externa de la pared celular, e incluso reemplazar a otras estructuras de la pared, son capaces de cumplir diversos roles y funciones biológicas, entre ellas, las de actuar como una

capa de protección, formar parte en el reconocimiento y adhesión celular o actuar como receptores para fagos (Sleytr y Beveridge, 1999).

En las bacterias lácticas, las S-layer han sido encontradas en el género *Lactobacillus* (y se han estudiado con algún detalle para *Lb. helveticus*, *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus* y *Lb. crispatus* (Capra, 2007).

Además, se pueden encontrar **polisacáridos** asociados a la envoltura celular. Entre ellos, podemos encontrar los polisacáridos capsulares que conforman una gruesa cubierta unida de manera covalente a la pared celular. Los polisacáridos de pared que decoran el envoltorio celular, pueden encontrarse unidos covalentemente o asociados en forma laxa al PG. La contribución de este tipo de polisacáridos no está debidamente comprendida en bacterias lácticas. Sin embargo, probablemente, su principal función radique en mediar interacciones con componentes del medio externo. También pueden comportarse como receptores de lectinas específicas, mediando la adhesión de otros microorganismos. La adsorción fágica casi siempre involucra a los carbohidratos de pared celular (Delcour y col., 1999) como fue demostrado para diversas especies de bacterias lácticas como *Lb. casei* (Ishibashi y col., 1982) y *L. lactis* (Valyasevi y col., 1990). Por último, otro tipo de polisacáridos asociados a las bacterias son los EPS que pueden ser capsulares o estar libres en el medio y presentan una gran diversidad. En particular, como se mencionó anteriormente, las bacterias lácticas filantes producen un rango de EPS de diferentes texturas que presentan gran interés tecnológico (Delcour y col., 1999).

4.1.2. Penetración del ADN fágico

Luego de la unión irreversible, el genoma fágico es inyectado desde la cápside y a través de la cola del fago, hacia el interior de la célula bacteriana. La partícula fágica vacía (fantasma) permanece en la porción exterior de la superficie bacteriana (Quiberoni y col., 2011). La punta de la cola cuenta con un mecanismo enzimático a través del cual puede penetrar la capa del PG y la membrana interna de la célula. Luego de esto, se liberan ciertos mecanismos que estuvieron bloqueando la salida del ADN desde la cápside. En el interior celular, el ADN es sometido a diversos procesos que dependen del contenido energético de la célula (Guttman y col., 2005).

En el caso del fago C2 de *L. lactis*, se ha comprobado que después de su adsorción reversible a los receptores de la pared celular, se une irreversiblemente a una proteína de la membrana plasmática conocida como PIP (Phage Infection Protein), lo que, posteriormente,

provocaría la inyección del ADN viral. La proteína PIP está codificada en el cromosoma bacteriano (Josephsen y Neve, 2004).

Generalmente, esta etapa requiere energía celular (ATP) y la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y depende de la maquinaria de síntesis de proteínas de la cepa hospedadora (Quiberoni y col., 2011). Los cationes divalentes podrían actuar como contraiones durante la translocación del ADN a través de la membrana celular (Josephsen y Neve, 2004). En particular, para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, se observó que estos iones son constituyentes de la partícula fágica y estabilizan el ADN condensado en la cápside (Alatossava y col., 1998).

4.1.3. Biosíntesis de componentes virales y maduración de la partícula fágica

Poco después de la inyección del ADN viral se detiene la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del hospedador y comienza a degradarse su genoma. La maquinaria metabólica del hospedador se pone al servicio del virus, sintetizando sus ácidos nucleicos y proteínas (Quiberoni y col., 2011).

En la etapa inicial, la ARN polimerasa del hospedador reconoce algunos promotores fágicos, permitiendo la transcripción de los genes. Los genes que se transcriben tempranamente podrían proteger al genoma fágico y reestructurar al hospedador de acuerdo a las necesidades del fago. La degradación del ADN del hospedador y la inhibición de la traducción de los ARNm de la cepa hospedadora son mecanismos que pueden contribuir con la reprogramación de la célula para la síntesis de nuevas partículas fágicas. En esta primera etapa, ocurre la inactivación de las proteasas del hospedador y el bloqueo de las enzimas de restricción, lo cual provoca la detención de la biosíntesis de macromoléculas del hospedador o la destrucción de algunas de sus proteínas. Posteriormente, se sintetiza nuevo ADN fágico y se transcriben ciertos genes que codifican para componentes proteicos de las partículas fágicas. Para algunos fagos, esta etapa implica la síntesis de proteínas de unión a ADN y de factores que reprograman la ARN polimerasa del hospedador. Además, en algunos casos, los fagos pueden codificar sus propias ARN polimerasas (Guttman y col., 2005).

Hacia el final de la etapa de maduración se sintetizan las nuevas proteínas virales. Las proteínas estructurales se ensamblan y el nuevo ADN viral se empaqueta en forma condensada en las cabezas. En uno de los vértices de la cabeza hay un complejo proteico que sirve como punto de inicio para el ensamblaje de la cabeza, un sitio de acoplamiento de las enzimas que participarán en el empaquetamiento del ADN, un conducto para el pasaje del ADN y un sitio

de unión para la cola. Finalmente, la cola se une a la cabeza para dar lugar a la partícula viral completa (Josephsen y Neve, 2004; Guttman y col., 2005).

4.1.4. Lisis de la cepa hospedadora

El ciclo lítico se completa cuando la progenie fágica es liberada del interior de la célula huésped hacia el medio ambiente. En esta etapa participan dos enzimas codificadas en el genoma fágico: holina y lisina. La enzima holina produce la desorganización de la membrana celular, generando poros que permiten el acceso de la lisina a la pared celular. La lisina actúa degradando el PG de la pared celular. En fagos de bacterias lácticas se encontraron dos tipos de lisinas: algunos fagos de lactobacilos y de lactococos poseen muraminidasas mientras que los fagos de *St. thermophilus* y ciertos fagos de lactococos contienen amidasas (Josephsen y Neve, 2004). Por otro lado, las lisinas fágicas liberadas al medio pueden causar la lisis de células no infectadas e incluso de cultivos resistentes al fago. Este fenómeno recibe el nombre de lisis desde el exterior (Capra, 2007).

El ciclo lítico de un sistema cepa/fago se caracteriza por el período de latencia y el burst size, que se determinan en experiencias de crecimiento en un paso. Al inicio del experimento, el número de placas de lisis permanece constante ya que corresponde al número de infecciones productivas obtenidas después de la adsorción. Este período se denomina fase de latencia y el número de placas de lisis formadas en este período representa los centros de infección. Luego, el número de placas de lisis se incrementa a medida que las células infectadas lisan (rise time). Cuando todas las células infectadas lisaron, la concentración fágica permanece constante. La relación entre los fagos producidos con respecto al número de centros de infección es definida como burst size, mientras que el tiempo transcurrido hasta que los recuentos fágicos permanecen constantes se denomina período de lisis o burst time (Maloy y col., 1994). Estos parámetros varían de acuerdo al sistema estudiado y pueden estar influenciados por factores experimentales (pH, temperatura, etc.), el estado nutricional del huésped y la disponibilidad de electrolitos (Capra, 2007).

Por otro lado, el tiempo en el cual se produce la lisis celular es afectado por las condiciones de crecimiento celular y las características genéticas del sistema. Si la lisis ocurre rápidamente, se generarán escasas nuevas partículas fágicas luego del ciclo. Por otro lado, si el ciclo demanda tiempos prolongados, se verán disminuidas las oportunidades para la infección y nuevos ciclos de reproducción (Guttman y col., 2005).

4.2. Ciclo lisogénico

En el ciclo lisogénico, los pasos involucrados en la adsorción del fago a la célula sensible y la inyección del ADN, son similares a los que se producen durante el ciclo lítico, pero en este caso el ADN viral se inserta en el cromosoma bacteriano. Como se mencionó anteriormente, el genoma del fago temperado permanece en el hospedador en estado latente (profago) (Lyne, 2011).

Las bacterias que transportan profagos reciben el nombre de lisógenas y bajo ciertas condiciones, el fago temperado puede ser inducido a seguir un ciclo lítico de multiplicación. La transición entre los ciclos lisogénicos y líticos recibe el nombre de inducción lisogénica y ocurre como respuesta a daños sufridos en el ADN (Rodríguez González y col., 2010). Entre los factores que pueden provocar esta transición se encuentran la luz solar, la presencia de peróxido de hidrógeno, cambios de temperatura, aunque los más eficaces son la mitomicina C y la radiación UV-C (254 nm) (Weinbauer, 2004).

La observación de liberación de profagos a través de lisis en medio líquido o formación de placas de lisis en medio agarizado, muchas veces puede arrojar resultados negativos. Sin embargo, esto no significa que la cepa no haya sido inducida ya que muchas veces es difícil encontrar una cepa indicadora. Para poder visualizar la presencia de fagos temperados se pueden utilizar microscopía electrónica y extracción del ADN viral a partir de sobrenadantes de cepas inducidas. Luego de esto, la presencia de ADN viral en el cromosoma bacteriano debería ser confirmada por hibridación de Southern (Mercanti y col., 2011).

El genoma de fagos líticos generalmente codifica para proteínas que resultan letales para las cepas hospedadoras. Algunas de ellas pueden degradar el genoma bacteriano, perturbar su replicación o transcripción, destruir algunas de las enzimas del hospedador o alterar la membrana bacteriana. En cambio, los fagos temperados acarrean pocas proteínas letales. Sin embargo, estos fagos codifican una proteína que bloquea la transcripción de otros genomas fágicos así como también el ciclo infectivo de fagos del mismo grupo (Guttman y col., 2005). Es por ello que los fagos temperados pueden proteger a su cepa hospedadora de las infecciones provocadas por otros fagos (Rodríguez González y col., 2010). Además, los fagos temperados liberados no pueden infectar otras células dentro del mismo cultivo debido a que ellas son inmunes a la infección. Sin embargo, sí pueden infectar a otras cepas presentes en el ambiente (Lyne, 2011). Por esta razón, la lisogenia resulta importante ya que podría contribuir a la propagación de las partículas fágicas en los ambientes industriales debido a que los fagos liberados podrían encontrar un blanco de ataque entre las cepas componentes de los cultivos iniciadores. Debido a su importancia y como se mencionó anteriormente, la ausencia

de cepas lisógenas debería ser considerada como criterio al momento de seleccionar el cultivo iniciador para uso industrial (Quiberoni y col., 2011).

Cuando un fago infecta una célula, puede seguir el ciclo lítico o el lisogénico. Esto depende de la presencia de dos proteínas codificadas por el genoma viral y que actúan como reguladores de la transcripción. Estas proteínas reprimen la expresión de los genes asociados a uno de los ciclos, favoreciendo el desarrollo del otro (Josephsen y Neve, 2004). Además, puede depender del estado energético, concentración de nutrientes, condiciones ambientales y multiplicidad de infección (Rodríguez González y col., 2010). La lisogenia se ve favorecida cuando la fuente de nutrientes es más baja que la necesaria para mantener la infección o cuando la velocidad de destrucción de los fagos libres es muy alta como para permitir la replicación del fago. Por lo tanto, la lisogenia predominaría a baja densidad celular y elevada multiplicidad de infección mientras que la situación contraria favorecería el ciclo lítico de los fagos (Weinbauer, 2004; Rodríguez González y col., 2010).

La lisogenia está ampliamente difundida entre las BAL (Quiberoni y col., 2011). Es muy común en cepas de *Lactococcus* y de *Lactobacillus*, aunque se ha encontrado escasa cantidad de cepas lisógenas en *St. thermophilus* (Rodríguez González y col., 2010). En particular, se observó la presencia de más de un profago en cepas de *Lactococcus*, las cuales reciben el nombre de polilisogénicas. Con respecto a *Lactobacillus*, la lisogenia está ampliamente distribuida en cepas probióticas y se han encontrado homologías entre los fagos líticos y temperados para diversas especies de este género, principalmente en *Lb. casei* (Rodríguez González y col., 2010; Mercanti y col., 2011).

Caso y col. (1995) investigaron la lisogenia en *Lb. plantarum* y encontraron que el 12,7% de los sobrenadantes de cultivos tratados con mitomicina C inhibieron el desarrollo de otras cepas. Dentro de este grupo, dos cepas fueron capaces de producir placas de lisis sobre una cepa indicadora.

Por otro lado, la incorporación del ADN viral al genoma bacteriano puede generar ciertos cambios en las propiedades de las cepas hospedadoras (como resistencia a antibióticos u otras condiciones ambientales), lo cual se conoce como conversión lisogénica (Rodríguez González y col., 2010). Teniendo en cuenta que la lisogenia está ampliamente distribuida en cepas del género *Lactobacillus* y que a dicho género se le han asociado propiedades probióticas, algunos autores sostienen una relación entre la lisogenia y la funcionalidad de lactobacilos probióticos. De esta manera, la lisogenia podría influir sobre la probioticidad de determinadas cepas ya sea mejorándola o contrarrestándola. Si esto ocurriera, las propiedades probióticas de las bacterias serían bastante inestables y justificaría un continuo monitoreo a lo

largo de su uso como aditivo (Capra y Mercanti, 2012). Por otro lado, un estudio reciente (Lepage y col., 2008) reportó elevadas concentraciones de bacteriofagos asociados a la mucosa intestinal. La presencia de fagos en el ambiente gastrointestinal podría afectar el funcionamiento de los lactobacilos probióticos, si los mismos resultan infectivos de estas cepas (Capra y Mercanti, 2012).

La pseudolisogenia (estado estable entre fagos y hospedadores) es un fenómeno a través del cual fagos virulentos se propagan permanentemente a través de células que son sensibles a ellos. Aunque hay producción espontánea de nuevos viriones, el cultivo suele crecer normalmente debido a la existencia de células insensibles a los fagos presentes y con capacidad suficiente para llevar a cabo la fermentación sin que se produzca un retraso apreciable en la producción de ácido (Weinbauer, 2004).

5. Mecanismos de fagorresistencia

Como se mencionó anteriormente, algunas especies bacterianas son extensamente usadas en procesos fermentativos. Como consecuencia de los elevados volúmenes de células cultivados diariamente, la gran mayoría de las industrias fermentativas, sufren, con distinta frecuencia, problemas de contaminación con fagos (Labrie y col., 2010). Como consecuencia de la exposición continua de las células bacterianas a las partículas fágicas, las cepas adquirieron mecanismos de defensa naturales frente a fagos que aseguren su supervivencia (Quiberoni y col., 2011).

Es común encontrar varios mecanismos de defensa en la misma cepa (Labrie y col., 2010). Estos mecanismos están muy estudiados en *L. lactis* y *St. thermophilus*. En el caso de *Lactococcus*, pueden estar codificados tanto en el cromosoma como en plásmidos. Sin embargo, debido a que, en general, las cepas de *St. thermophilus* presentan escasos plásmidos, estos mecanismos se encuentran codificados a nivel cromosómico (Quiberoni y col., 2011).

Los mecanismos naturales de fagorresistencia se detallan a continuación.

5.1. Bloqueo de la adsorción

En sistemas sensibles, las partículas fágicas se adsorben eficientemente (generalmente > 90%) a la superficie celular. Sin embargo, algunas cepas que son resistentes, evidencian reducidas tasas de adsorción. Esta disminución en la adsorción fágica puede ser debida a tres mecanismos. Uno de ellos ocurre a través del bloqueo de los receptores fágicos. En este caso, para limitar la propagación del fago, la bacteria puede adaptar la estructura o conformación tridimensional de los receptores de su superficie celular. Sin embargo, los fagos pueden

evolucionar a fines de reconocer estos nuevos receptores (Figura 17A) (Labrie y col., 2010). En algunos casos, puede existir una reducción o completa ausencia de los receptores fágicos (Quiberoni y col., 2011).

Otro mecanismo implica la producción de polímeros extracelulares como EPS que podrían interferir en la interacción fago y superficie celular ya sea enmascarando al receptor o bien uniéndose a él (Labrie y col., 2010; Quiberoni y col., 2011). Sin embargo, los fagos han evolucionado para reconocer específicamente a estos polímeros extracelulares y en algunos casos, degradarlos. Las enzimas encargadas de llevar a cabo esta tarea son hidrolasas y liasas, las cuales pueden estar unidas a partículas fágicas o bien como enzimas solubles libres provenientes de las células lisadas (Figura 17B) (Labrie y col., 2010).

Un tercer mecanismo, que fue evidenciado en *E. coli*, involucra la producción de inhibidores competitivos. Ciertas moléculas presentes naturalmente en los ambientes bacterianos pueden unirse a los receptores fágicos, no dejándolos disponibles para las partículas fágicas (Labrie y col., 2010).

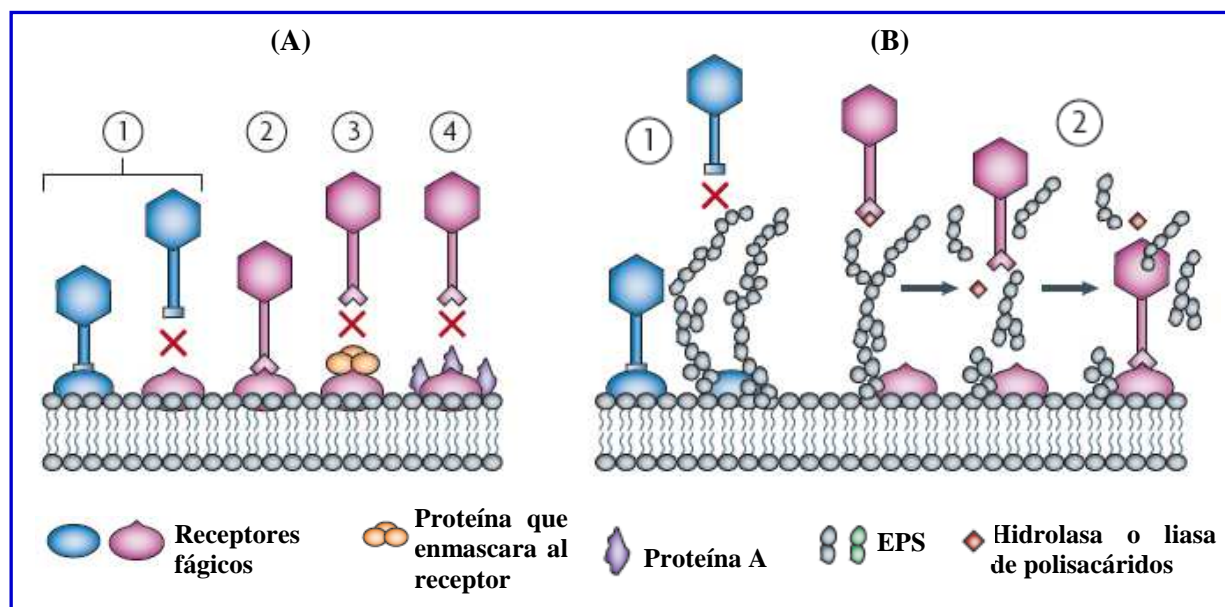


Figura 17. Estrategias utilizadas por las bacterias para impedir la adsorción fágica. **A)** Bloqueo de los receptores fágicos. La bacteria puede adquirir resistencia a través de la modificación de sus receptores fágicos (1), sin embargo los fagos pueden evolucionar para reconocer los nuevos receptores (2). La bacteria también puede producir proteínas que enmascaren a los receptores (3 y 4). **B)** Producción de exopolisacáridos (EPS) que impide la unión a los receptores (1). Sin embargo, las enzimas hidrolasas y liasas pueden degradar a los EPS permitiendo la unión receptor-fago (2) (Labrie y col., 2010).

5.2. Inhibición de la inyección del ADN fágico

Hasta el momento se identificaron y estudiaron pocos sistemas presentando este mecanismo de fagoresistencia. Aquí el fago se adsorbe sobre la superficie celular, pero luego la etapa de inyección del ADN fágico no se concreta (Quiberoni y col., 2011).

En esta etapa, generalmente, participa un conjunto de proteínas denominado Sie (Sistema de exclusión de la superinfección) que bloquea la entrada del ADN fágico dentro de la célula. Estas proteínas pueden estar ancladas a la membrana celular o bien asociadas a componentes de la membrana (Figura 18) (Labrie y col., 2010).

Estos sistemas fueron estudiados principalmente en *L. lactis*. El sistema Sie₂₀₀₉ fue identificado en el genoma del profago Tuc2009 (*Lactococcus*). Este sistema le confiere resistencia a la cepa debido a la inhibición de la transferencia del ADN fágico al interior celular. Recientemente, se han encontrado sistemas de este tipo en *St. thermophilus*. En este caso, el genoma del profago TP-j34 codifica una lipoproteína que bloquea la inyección de ADN fágico (Labrie y col., 2010).

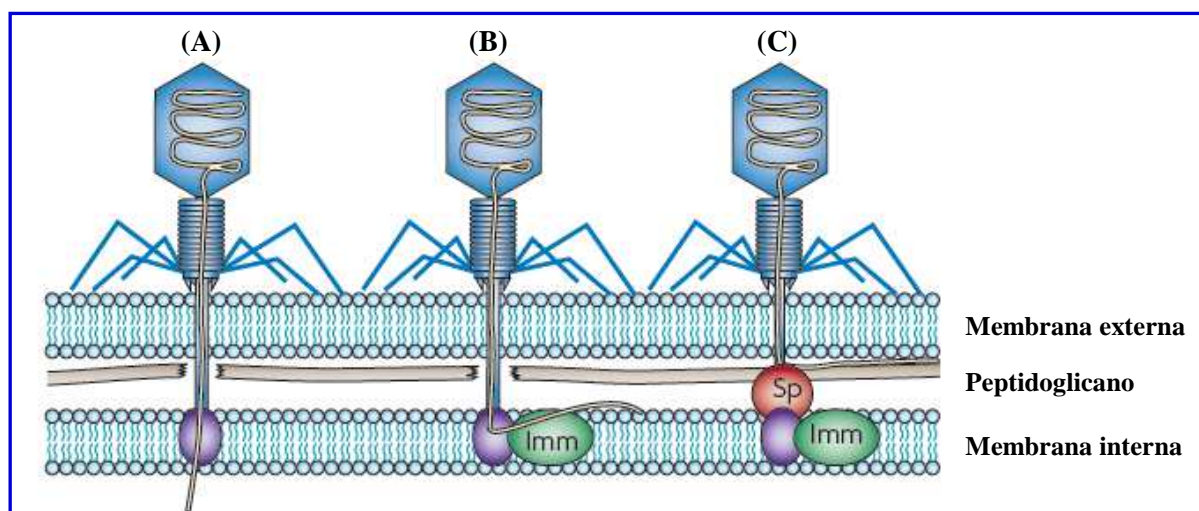


Figura 18. Inhibición de la inyección del ADN fágico hacia el interior de la célula. **A)** Infección fágica normal. La capa de peptidoglicano es degradada y una proteína asociada a la membrana interna participa en el pasaje del ADN fágico hacia el interior celular. **B)** La proteína Imm codificada en el genoma del fago T4 evita la entrada del ADN al citoplasma. **C)** La proteína Sp (fago T4) bloquea la degradación del peptidoglicano y retiene al ADN fágico entre éste y la membrana celular externa (Labrie y col., 2010).

5.3. Restricción/Modificación (R/M)

Estos sistemas constituyen el primer mecanismo de defensa intracelular contra los fagos. Luego de producirse la adsorción fágica y la inyección del ADN, el ácido nucleico viral es reconocido por la célula como extraño y es degradado (Figura 19). En ello participan dos

sistemas enzimáticos complementarios: una endonucleasa de restricción, que hidroliza el ADN foráneo, y una metilasa que modifica el ADN celular en determinadas secuencias específicas, de modo que resulte inmune a la hidrólisis mediada por su propia enzima de restricción (Quiberoni y col., 2011). La metilación se realiza sobre una adenina o citosina localizada dentro de la secuencia de reconocimiento y por transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina. El clivaje tomará lugar dentro o cerca del sitio de reconocimiento o bien ocurrirá al azar. Este mecanismo no depende de la especie ni de la morfología, sólo necesita que la secuencia de reconocimiento del sistema R/M esté presente en el ADN fágico y que esta secuencia no haya sido modificada por metilación (Josephsen y Neve, 2004). La ventaja de estos sistemas es que finalizan la infección antes de que la célula se muera o dañe por acción de fagos (Sturino y Klaenhammer, 2004). Sin embargo, no resultan muy eficientes aunque sí lo son en combinación con otros (Josephsen y Neve, 2004).

Basándose en la estructura enzimática, secuencias de reconocimiento en el ADN y sitios de clivaje, se pueden conformar cuatro grupos de sistemas R/M: I, II, III y IV. Hasta el momento, sólo los sistemas I, II y III fueron encontrados en BAL (Quiberoni y col., 2011).

Estos sistemas pueden estar codificados tanto en plásmidos (*Lactococcus*) como en cromosomas (*St. thermophilus*). En *Lactobacillus*, estos sistemas fueron evidenciados en *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. plantarum*, y generalmente aparecen asociados con otros mecanismos de fagoresistencia (Quiberoni y col., 2011).

La eficiencia de un sistema R/M es directamente proporcional al número de sitios de reconocimiento en el ADN del fago. Sin embargo, los fagos han desarrollado diversos mecanismos a través de los cuales pueden escapar a la restricción. Uno de ellos es la disminución o ausencia de secuencias presentes en el genoma viral reconocidas por las enzimas de restricción bacteriana, debido a mutaciones en su genoma. Por otro lado, algunos fagos han vencido los sistemas R/M a través de la adquisición de genes de la familia metilasa en su genoma, lo cual le permitiría metilar su propio ADN (Figura 19) (Guttman y col., 2005; Labrie y col., 2010). En estos casos, si el ADN fágico es metilado, puede dar origen a una progenie de fagos modificados que ya no resultará restringida por este sistema R/M en subsiguientes rondas de infección (Quiberoni y col., 2011). Por lo tanto, estos fagos modificados podrían infectar a bacterias que presenten los mismos sistemas R/M, pero no a aquellas con un mecanismo R/M diferente, debido a que serían clivados por las enzimas de restricción (Labrie y col., 2010).

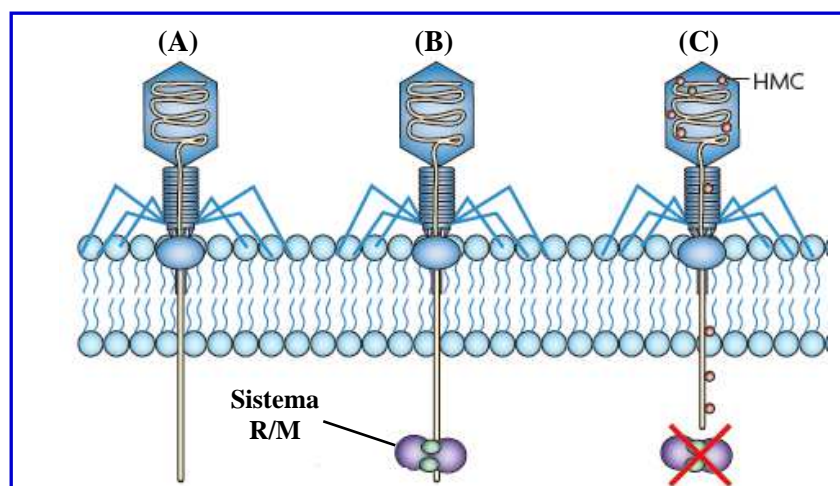


Figura 19. Mecanismo de Restricción/Modificación (R/M). **A)** Infección fágica normal. **B)** La partícula fágica infecta a una cepa resistente que contiene sistemas del tipo R/M. El genoma fágico es clivado en sitios específicos por enzimas de restricción. **C)** El genoma fágico contiene hidroximetilcitosina (HMC), por lo tanto puede ser metilado y vencer al sistema R/M (Labrie y col., 2010).

5.4. Sistemas CRISPRs

Es el mecanismo de fagorresistencia más recientemente evidenciado en procariontas. Hasta la fecha, fue evidenciado en *St. thermophilus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. crispatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. salivarius* (Garneau y Moineau, 2011), aunque ha sido estudiado en detalle en *St. thermophilus*.

Las secuencias CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) son repeticiones palindrómicas cortas regularmente dispuestas formando una matriz. Estas secuencias de ADN forman un loci (posiciones fijas dentro del cromosoma) que otorga inmunidad a la bacteria frente a ácidos nucleicos extraños, incluyendo genoma fágico y plásmidos. Estos loci están compuestos por secuencias de 21 a 48 bp que se repiten formando una matriz y entre las cuales aparecen secuencias variables denominadas espaciadores, cuya longitud oscila entre 26 y 72 bp. Además, adyacentes a estas estructuras, aparecen los genes *cas* (genes asociados a CRISPR) (Labrie y col., 2010). Los genes *cas* codifican un amplio y heterogéneo grupo de proteínas que contienen dominios funcionales típicos de nucleasas, helicasas, polimerasas y proteínas asociadas a polinucleótidos. Los CRISPR en combinación con las proteínas *cas* constituyen los sistemas CRISPR-*Cas* y, si bien son comúnmente localizados en cromosomas, en algunos casos, se han encontrado en plásmidos (Horvath y Barrangou, 2010).

Cuando una cepa fago sensible es enfrentada a fagos virulentos, se producirá el desarrollo de mutantes espontáneos fagorresistentes. Como consecuencia de la interacción cepa/fago, los mutantes incorporan a su cromosoma las secuencias espaciadoras provenientes

del material genético del fago, en el extremo 5' de un locus CRISPR, lo cual le otorga resistencia a dicho fago. En algunos casos, los mutantes pueden adquirir diversos espaciadores del mismo genoma fágico (Labrie y col., 2010). Se ha demostrado que las proteínas *cas* juegan un rol importante en el reconocimiento del ADN extraño y su incorporación al genoma bacteriano (Figura 20) (Horvath y Barrangou, 2010).

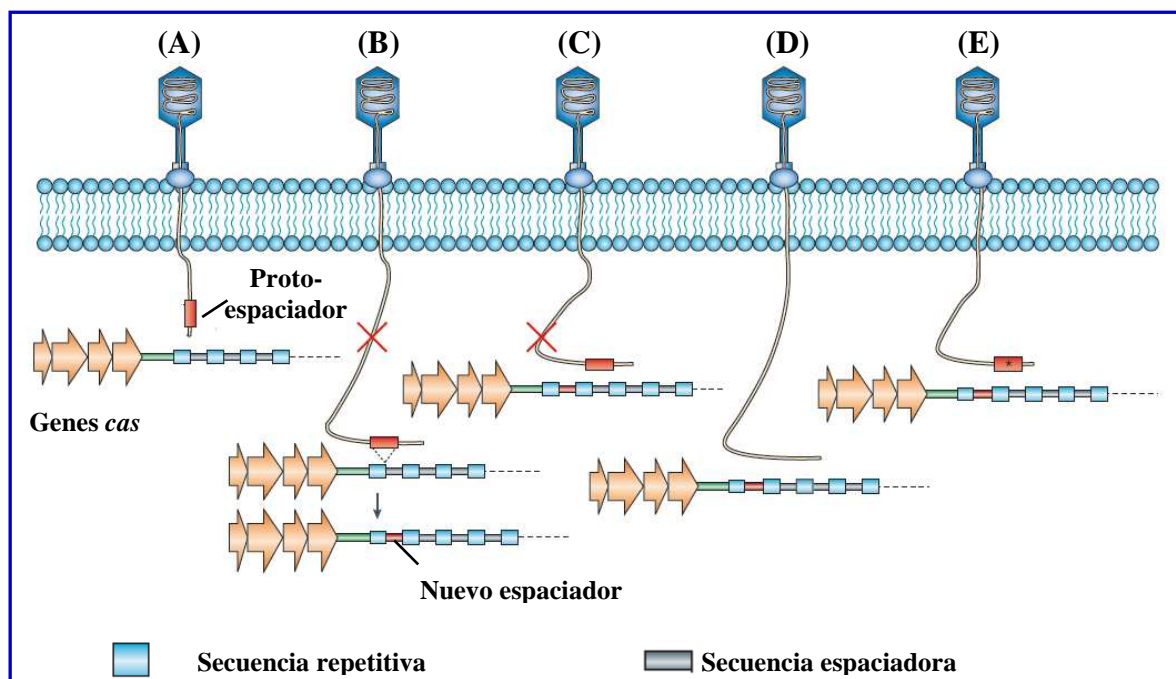


Figura 20. Sistema CRISPR. **A)** El ADN fágico ingresa al interior celular y continúa su ciclo lítico. **B)** Una pequeña porción de células infectadas sobrevivirá a la infección. El loci CRISPR de las células resistentes adquirirá una nueva secuencia repetitiva (duplicada del loci CRISPR) y un nuevo espaciador (proveniente del genoma fágico). **C)** La secuencia nucleotídica adquirida será la responsable de la fagoresistencia, de tal manera que un fago que posea en su genoma una secuencia idéntica a la del proto-espaciador será incapaz de infectar a la célula. **D)** Sin embargo, estos mutantes podrán ser infectados por fagos que no posean el mismo proto-espaciador. **E)** Los fagos que hayan adquirido mutaciones en su proto-espaciador podrán eludir al sistema CRISPR y completar exitosamente su ciclo lítico (Labrie y col., 2010).

El mecanismo molecular a través del cual se incorporan estas secuencias al genoma bacteriano, es desconocido. La única característica en común es la presencia, en el genoma fágico, de una secuencia nucleotídica corta conservada (denominada PAM) cercana a la secuencia nucleotídica que incorporará la bacteria. La secuencia y la ubicación del PAM varía entre los sistemas CRISPR-*Cas* (Labrie y col., 2010).

En cuanto al mecanismo de acción, se plantean diversas hipótesis. Una de ellas sugiere que este sistema actúa como un mecanismo bacteriano de interferencia a la replicación del genoma viral. Por otro lado, el análisis de algunas proteínas *cas* demostró que algunas de ellas clivan el ARNm de CRISPR, generando ARNs más pequeños que posteriormente se dirigirán

al material genético del fago (por apareamiento de bases) y lo degradarán (Labrie y col., 2010).

Sin embargo, ciertos fagos pueden escapar de la acción de los sistemas CRISPR a través de mutaciones (o deleciones) en las secuencias incorporadas por la bacteria o en las secuencias PAM (Figura 20) (Labrie y col., 2010).

La continua incorporación de secuencias espaciadoras y la respuesta de fagos frente a este evento, ilustra la co-evolución dinámica entre éstos y las bacterias (Labrie y col., 2010).

5.5. Infección abortiva (Abi)

Este mecanismo está caracterizado por un normal desempeño de las primeras etapas de la infección seguida por una interrupción del ciclo de multiplicación fágica. En este caso se produce la liberación de pequeñas cantidades de partículas fágicas o bien, directamente, no se libera la nueva progenie (Quiberoni y col., 2011).

Estos sistemas incluyen mecanismos que interfieren en diversas etapas de la multiplicación fágica. Pueden afectar la replicación del genoma fágico, la transcripción, traducción a proteínas, inhibir la producción de las proteínas de la cápside, el empaquetamiento del ADN fágico, o provocar la lisis prematura de la célula infectada (Labrie y col., 2010). Así, se los puede clasificar teniendo en cuenta su habilidad para actuar temprana (antes o durante la replicación del ADN) o bien tardíamente (luego de la replicación) (Josephsen y Neve, 2004).

La manifestación fenotípica de este mecanismo se evidencia por una reducción de la eficiencia de plaqueo (EOP, Efficiency of plaquing), completa ausencia de placas de lisis o reducción de su tamaño y disminución del burst size (Josephsen y Neve, 2004; Quiberoni y col., 2011).

Este sistema está muy difundido en *Lactococcus*. Hasta el momento, se han encontrado y caracterizado 23 sistemas Abi, los cuales si bien evidenciaron un modo de acción particular, comparten características en común. En *St. thermophilus* y *Lactobacillus* se ha reportado un solo sistema Abi (Garneau y Moineau, 2011; Quiberoni y col., 2011). La cepa *Lb. plantarum* NGRI0101, aislada de ensilados, posee dos plásmidos, pLKL (6.8 kb) y pLKS (2 kb) y el último codifica un mecanismo de fagorresistencia posiblemente asociado a la infección abortiva que podría afectar la replicación del ADN fágico (Eguchi y col., 2000).

Las cepas que presentan este mecanismo de resistencia fágica son ampliamente usadas a nivel industrial. Como consecuencia de ello, los fagos han sufrido mutaciones para poder sobrepasar esta barrera de resistencia. Sin embargo, este mecanismo sigue siendo el más

eficiente entre los mecanismos de fagorresistencia y debería ser utilizado en combinación con los demás para mejorar la resistencia fágica de los cultivos iniciadores (Quiberoni y col., 2011).

6. Bacteriofagos de *Lactobacillus plantarum*

Se han aislados fagos de *Lb. plantarum* de matrices muy diversas como suero de quesería, ensilados de maíz, kimchi, cultivo iniciador de carne y efluentes. Estos fagos, sus cepas sensibles y fuentes de aislamiento se detallan en la Tabla 2.

Entre los fagos de *Lb. plantarum*, los resaltados en letra **negrita** en la Tabla 2 se encuentran estudiados con mayor detalle en cuanto a sus características fenotípicas y genotípicas. Con respecto a estudios moleculares, hasta la fecha, se han secuenciado cuatro fagos de *Lb. plantarum*: LP65 (Chibani-Chennoufi y col., 2004), JL-1 (Lu y col., 2005) y gle (Kodaira y col., 1997) y Sha1 (Yoon y col., 2011).

Además, se han aislado otros fagos que, hasta el momento, fueron estudiados en menor medida. Entre ellos, el fago LP45 aislado de ensilados en una granja en Italia, el fago LP76 aislado de una bebida tradicional de Ecuador a base de maíz fermentado y dos fagos (LP43 y LP78) cuyo origen es desconocido. Adicionalmente, un total de 15 fagos, denominados CC1 a CC15, fueron aislados de café fermentado (Chibani-Chennoufi y col., 2004).

Existen reportes de problemas asociados a fagos de *Lb. plantarum* durante la elaboración de alimentos vegetales fermentados. Durante la fermentación de pepinos, la infección fágica provocada por el fago JL-1 sobre el cultivo iniciador comercial *Lb. plantarum* MU45, afectó de manera negativa el proceso de fermentación, permitiendo el desarrollo de microorganismos alterantes o patógenos (Lu y col., 2003a). Por otro lado, se aislaron fagos de *Lb. plantarum* durante la elaboración comercial de chucrut a diversos tiempos de fermentación (Yoon y col., 2002; Lu y col., 2003b). En los días iniciales de fermentación, se aislaron fagos de *Leuconostoc* mientras que los fagos de *Lb. plantarum* fueron aislados posteriormente (desde 7 a 60 días de fermentación). La mayoría de estos fagos fueron capaces de lisar entre 5 y 6 cepas y algunas de ellas fueron sensibles a dos o más fagos (Lu y col., 2003b).

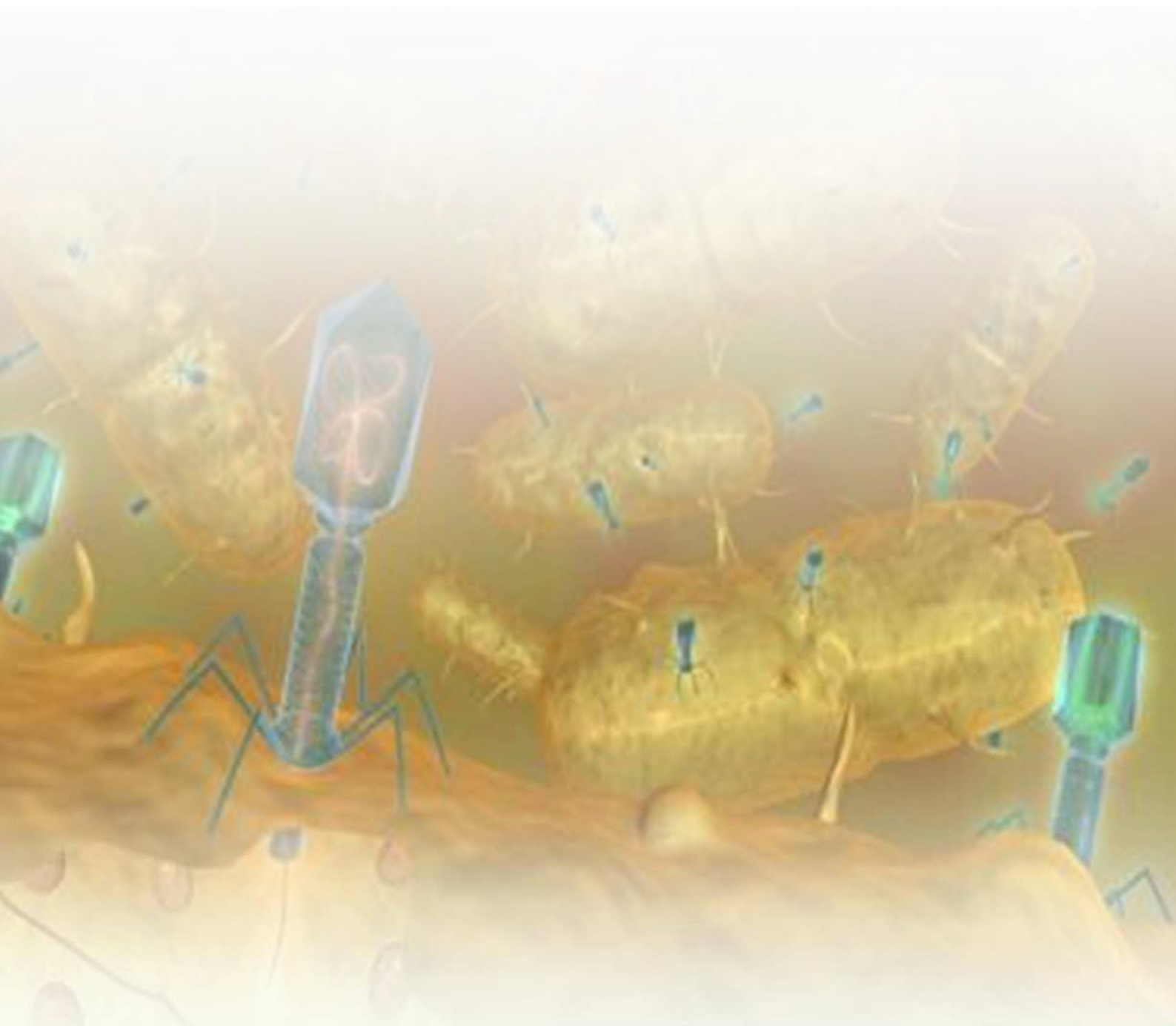
Con respecto a la industria cárnica, se llevaron a cabo ensayos a nivel de laboratorio a fines de conocer los efectos de la presencia de fagos durante los procesos fermentativos. Para ello, durante la elaboración de embutidos secos se utilizó como cultivo iniciador a la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014. Cuando dicha cepa fue infectada con el fago B2, se observaron

demoras en la producción de acidez (Nes y Sorheim, 1984). Por otro lado, a nivel industrial y durante la elaboración de salamines, se observó que luego de 2 semanas de fermentación se produjo la decoloración del producto. Este problema fue vinculado a la presencia de fagos, en particular del fago LP65. Este fago, además de infectar a *Lb. plantarum*, puede infectar a cepas de *Carnobacterium* sp. asociadas con la fermentación cárnica (Chibani-Chennoufi y col., 2004). Este comportamiento resulta extraño debido a que no se han reportado, hasta el momento, fagos que infecten a diversos géneros o a diferentes especies dentro del mismo género. Sin embargo, otros autores evidenciaron este comportamiento entre especies de *Lactobacillus*, en particular *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus*. Diversos fagos (PY1 a PY10, 22-D10 y 14-C8), pertenecientes a las familias *Myoviridae* y *Siphoviridae*, aislados de chucrut y de ensilados fueron capaces de infectar ambas especies (Doi y col., 2003; Lu y col., 2003b; Villion y Moineau, 2009). Por otro lado, Zhang y col. (2010) reportaron homologías entre profagos de *Lb. casei* y el profago Lp3, de *Lb. plantarum* (cepa WCSF1). A través de la comparación de los genomas fágicos se sugirió que los fagos podrían haber evolucionado a través de intercambio de módulos funcionales, genes individuales o segmentos de genes a través de eventos de recombinación. Así, un fago que originalmente infectaba a una especie podría haber adquirido la capacidad para infectar otras especies presentes en el mismo nicho ecológico. Sin embargo, otra teoría supone la presencia de similares receptores fágicos sobre la superficie celular de ambas especies (Lu y col., 2003b; Capra y Mercanti, 2012).

Tabla 2. Fagos de *Lb. plantarum* aislados de diversas matrices.

Fago	Cepa sensible	Ciclo de multiplicación	Origen	Referencia
PB	P219	Virulento	Aguas residuales	Sakurai y col., 1969
PH	P219	Virulento	Aguas residuales	
219	P219	Virulento	Aguas residuales	
786	P219	Virulento	Aguas residuales	
fri	A	Virulento	Cultivo iniciador para carne	Trevors y col., 1983
B2	ATCC 8014	Virulento	Efluentes anaerobios	Nes y col., 1988
LP-1	ATCC 8014	Virulento	Ensilado de maíz	Caso y col., 1995
LP-2	ATCC 8014	Temperado	Suero de quesería	
g1e	Gle	Temperado	Planta de fermentación en Japón	Kodaira y col., 1997
SC921	LA0280	Virulento	Kimchi	Yoon y col., 2001
Y1	LA280	Virulento	Kimchi	Yoon y col., 2001, 2002
JL-1	MU45	Virulento	Fermentación de pepino	Lu y col., 2003a
7-C4	7-C4	Virulento	Chucrut	Lu y col., 2003b
9-B4	9-B4	Virulento	Chucrut	
14-A4	14-A4	Virulento	Chucrut	
14-E10	14-E10	Virulento	Chucrut	
22-A2	22-A2	Virulento	Chucrut	
22-E2	22-E2	Virulento	Chucrut	
60-E4	60-E4	Virulento	Chucrut	
60-E8	60-E8	Virulento	Chucrut	
LP65	Desconocido	Virulento	Fermentación de carne	
FAGK1	ATCC 8014	Virulento	Kefir	De Antoni y col., 2010
FAGK2	ATCC 8014	Virulento	Kefir	
Sha1	-	Temperado	Kimchi	Yoon y col., 2011

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas

En este trabajo fue utilizada la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 proveniente de la colección ATCC (American Type Culture Collection, Manassa, Virginia, USA) como cepa hospedadora.

Para llevar a cabo los estudios de determinación del espectro de huéspedes fueron utilizadas 15 cepas adicionales. Las mismas se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Lb. plantarum* utilizadas en la determinación del espectro de huéspedes.

Cepa	Origen	Referencia
29		
33		
87	NSLAB ¹ (aisladas de queso cremoso)	Bude-Ugarte y col., 2006
89		
91		
PLN		-
WCSF1	Saliva humana	Kleerebezem y col., 2003
LMG9211	Colección INLAIN ²	-
3G-112	Colección INLAIN ²	-
O36	Colección INLAIN ²	-
SMQ-1112		-
SMQ-1113		-
SMQ-1114	Université Laval ³	-
SMQ-1115		-
SMQ-1116		-
		-

¹: NSLAB: Non Starter Lactic Acid Bacteria

²: INLAIN: Instituto de Lactología Industrial

³: Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses, Université Laval, Québec City, Canada

1.1. Conservación y reactivación de las cepas

Las cepas bacterianas fueron conservadas por congelamiento a -20°C y -80°C utilizando caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) suplementado con glicerol (15% v/v), como crioprotector. Para ello, las cepas fueron desarrolladas previamente durante 16-18 hs en caldo MRS a 37°C. Posteriormente, estos cultivos fueron adicionados al 20% a la solución

crioprotectora, repartidos en alícuotas de 1 ml en crioviales estériles, y finalmente congelados a -20 y a -80°C.

Las cepas conservadas por congelamiento fueron reactivadas en caldo MRS e incubadas a 37°C durante 16-18 hs. Para su posterior uso en los diferentes ensayos, las cepas reactivadas fueron reinoculadas en el mismo medio de cultivo e incubadas en similares condiciones.

2. Bacteriofagos

En el desarrollo de este trabajo fueron utilizados dos fagos líticos de la colección ATCC, identificados como ATCC 8014-B1 (B1) y ATCC 8014-B2 (B2) y dos fagos aislados previamente de gránulos de kefir en colaboración con el grupo dirigido por la Dra. Graciela De Antoni (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos - CIDCA, Universidad Nacional de La Plata - UNLP), denominados FAGK1 y FAGK2 (De Antoni y col., 2010). Como se mencionó anteriormente (Sección 1), la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 fue utilizada como cepa hospedadora de los cuatro fagos.

3. Metodología general empleada para el estudio de fagos de *Lactobacillus plantarum*

3.1. Conservación de los fagos

Los fagos fueron conservados en heladera (4°C) como un stock filtrado de alto título. También se dispuso de una reserva almacenada a -20°C y a -80°C de las suspensiones fágicas (en caldo MRS) adicionadas de glicerol (15% v/v).

3.2. Propagación de los fagos

Los fagos utilizados fueron propagados sobre su cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 empleando caldo MRS suplementado con CaCl₂ 10 mM (MRS-Ca) (Neviani y col., 1992). Un cultivo obtenido por incubación durante 16-18 hs de la cepa fue inoculado en caldo MRS-Ca fresco y adicionado del fago correspondiente a diferentes dosis infectivas (m.o.i., multiplicity of infection = concentración de partículas virales/concentración de células bacterianas), variables entre 10⁻² y 10⁻³ aproximadamente. Asimismo, se inoculó un tubo con el cultivo sin infectar (control), para monitorear el crecimiento normal de la cepa. Los tubos fueron homogeneizados (en forma suave y periódica) y examinados durante la incubación a 37°C por aproximadamente 5 hs. El m.o.i. elegido fue aquél para el cual la lisis completa se manifestó en forma más tardía, garantizando una máxima propagación de las partículas

fágicas. El lisado resultante fue prefiltrado (prefiltro MILLIPORE AP25) y filtrado (membranas MILLIPORE, diámetro de poro 0,45 μm), a fin de eliminar los restos celulares. Estas suspensiones fágicas se titularon a fin de confirmar una alta concentración ($> 10^8$ UFP/ml) de partículas infectivas y luego se almacenaron a 4°C (stock utilizado en todas las experiencias), -20°C y -80°C.

3.3. Titulación de fagos

La concentración de partículas fágicas (título) presente en los lisados obtenidos luego de las propagaciones, así como en todas las experiencias donde se cuantifiquen los viriones, se determinó por el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991). De acuerdo a ésta, en cajas de Petri divididas en cuartos y estériles, se depositaron 2,5 ml de agar MRS con CaCl_2 10 mM y glicina 100 mM (MRS-Ca-Gli) en cada cuadrante (Lillehaug, 1997) y se dejó solidificar. Por otro lado, se prepararon diluciones decimales de las suspensiones fágicas a testear, en caldo MRS. Se colocaron 100 μl de dichas diluciones en tubos de hemólisis conteniendo CaCl_2 (50 mM) y 100 μl de la suspensión celular de la cepa sensible (50 μl de un cultivo desarrollado por 16-18 hs diluido en 5 ml de caldo MRS fresco). Finalmente se agregó 1 ml de MRS soft agar (caldo MRS adicionado de agar bacteriológico al 0,6% m/v) e inmediatamente se volcó el contenido de los tubos de hemólisis en cada cuadrante de las placas con MRS agarizado, correspondiendo a las distintas diluciones efectuadas. Se dejó solidificar y se incubó en microaerofilia a 34°C durante 16-18 hs.

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

$$\text{Título (UFP/ml)} = n^\circ \text{ de placas de lisis} \times f_d \times 10$$

Donde f_d : factor de dilución

4. Caracterización de bacteriofagos

4.1. Caracterización molecular

Estos estudios incluyeron a los fagos de colección B1 y B2 y se llevaron a cabo en el Département de Biochimie et de Microbiologie, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval (Québec City, Canada) bajo la dirección del Prof. Sylvain Moineau y en el marco de una beca otorgada por la American Society for Microbiology (ASM).

4.1.1. Extracción del ADN fágico

La extracción del ADN fágico se realizó utilizando un Lambda DNA Maxi Kit (Qiagen) basado en la precipitación de las partículas fágicas con polietilenglicol (PEG) seguida de una cromatografía de intercambio iónico.

Para llevar a cabo la extracción del ADN fágico, se inocularon 500 ml de caldo MRS con la cepa sensible (1%) incubándose a 37°C hasta alcanzar una D.O._{560nm} de aproximadamente 0,1. Luego el cultivo fue adicionado de CaCl₂ (10 mM) y del fago B1 o B2, tal que la concentración final del mismo sea aproximadamente de 10⁶ UFP/ml. Una vez observada la lisis completa del cultivo, se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4°C, se recogió el sobrenadante y se verificó que la concentración fágica sea de al menos 10⁹ UFP/ml.

Al sobrenadante obtenido con anterioridad se le añadieron 800 µl de buffer L1 (300 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA; 20 mg/ml RNAsa A; 6 mg/ml DNAsa I) y 5 ml de MgSO₄ 1M, y se incubó a 37°C por 30 min. Luego de la incubación fueron agregados 100 ml de buffer L2 (3 M NaCl; 30% PEG 6000) a baja temperatura permaneciendo en hielo durante 60 min. A continuación se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido en 9 ml de buffer L3 (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM EDTA) y adicionado de 900 µl de proteinasa K (10 mg/ml) e incubado a 65°C por 30 min. Posteriormente fueron agregados 9 ml de buffer L4 (4% SDS) e incubado a 70°C durante 20 min. Luego del tratamiento térmico, 9 ml de buffer L5 (3 M acetato de potasio, pH 5,5) fueron añadidos e inmediatamente agitados en forma suave y centrifugados a 15000 g por 30 min a 4°C. El sobrenadante fue removido rápidamente y centrifugado nuevamente a 15000 g por 10 min a 4°C.

Posteriormente se realizó la calibración de la columna Qiagen-tip 500 utilizando 10 ml de buffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % etanol, 0,15% Triton X-100). El sobrenadante obtenido con anterioridad fue incorporado sobre la columna, dejando que fluya por gravedad y quedando el ADN retenido en la resina. Luego fue realizado un lavado utilizando 30 ml de buffer QC (1M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% etanol) y posteriormente el ADN se eluyó de la columna con 15 ml de buffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15% etanol) a baja temperatura y a un tubo limpio. Finalmente el ADN fue precipitado con 10 ml de isopropanol y centrifugado a 15000 g por 30 min a 4°C. Se adicionó igual volumen de etanol 70%, dejando reposar a temperatura ambiente por 5 min. El pellet fue disuelto en 500 µl de Tris-HCl, pH 8,0 y conservado a -20°C.

4.1.2. Perfiles de restricción

El ADN fágico fue digerido con las enzimas de restricción *MluI*, *HindIII*, *EcoRV* y *SaI* durante 3 hs, las cuales se usaron siguiendo las indicaciones del fabricante. La separación de los fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v), de acuerdo a lo descrito por Sambrook y Russell (2001).

4.1.3. Secuenciamiento del genoma fágico

Los genomas fágicos fueron secuenciados usando el sistema 454 GS FLX Titanium pyro sequencing (Roche Life sciences) de la plataforma para análisis genómico de la Université Laval (Québec City, Canada).

Las secuencias fueron editadas usando el software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Los ORFs (Open Reading Frames) fueron identificados mediante los programas ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y GeneMark (http://exon.biology.gatech.edu/genemark_prok_gms_plus.cgi). Un ORF fue considerado válido si el mismo fue precedido por la secuencia de Shine-Dalgarno para *Lb. plantarum* (AGAAAGGAGGTGATC) (Bringel y col., 1997). Las funciones para cada ORF fueron atribuidas usando el programa Blast2go (http://blast2go.bioinfo.cipf.es/start_blast2go) y BLASTp (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Estos resultados fueron reforzados con la búsqueda de dominios conservados de proteínas funcionales usando la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y EMBL interproscan sequence search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>). Los ARNt fueron identificados mediante el servidor tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE>) y confirmados usando el programa ARAGORN (Laslett y Canback, 2004). La frecuencia de utilización del codon (Codon usage) fue determinada usando el programa Count-codon disponible en la página web del DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). La utilización del codon para bacterias de *Lb. plantarum* fue obtenida de la base de datos de Kazusa del DNA Research Institute.

El peso molecular teórico (MM) así como también el punto isoelectrico (pI) de las proteínas fueron calculados usando la herramienta ProtParam disponible en el sitio web ExPASy (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

4.1.4. Purificación de los fagos

Los fagos B1 y B2 fueron purificados por ultracentrifugación mediante dos gradientes consecutivos de CsCl (Guglielmotti y col., 2009). Para ello, se inoculó 1 litro de caldo MRS con la cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 (1%), incubándose a 37°C hasta alcanzar una D.O._{560nm} de aproximadamente 0,1. Luego el cultivo fue adicionado de CaCl₂ (10 mM) y 300 µl del fago B1 o B2 (concentración final de fagos de 10⁴ - 10⁵ UFP/ml). El cultivo lisado fue centrifugado a 8000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante recuperado fue adicionado de NaCl (0,5 M) y polietilenglicol (PEG 8000) en una concentración final de 10%. Debido a que no fue posible obtener suspensiones fágicas de alto título para el fago B1 siguiendo esta metodología, se realizó una pequeña modificación. Una vez que el cultivo fue lisado, fue adicionado de NaCl 0,5 M permaneciendo durante 1 h a 4°C, luego fue centrifugado (8000 g, 15 min, 4°C) y finalmente fue agregado el PEG (10%).

Para ambos fagos, una vez que el PEG se disolvió completamente, el sobrenadante fue incubado a 4°C durante toda la noche, con agitación suave. Luego de remover el sobrenadante con una centrifugación a 8000 g por 15 min a 4°C, el pellet fue resuspendido con 5 ml de buffer P 1X (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄).

El gradiente discontinuo de cloruro de cesio fue preparado con las siguientes soluciones utilizando buffer P 1X como diluyente:

Solución A: 4,2 g de CsCl en un volumen de 8 ml (densidad = 1,35)

Solución B: 6,2 g de CsCl en un volumen de 8 ml (densidad = 1,53)

Solución C: 8,2 g de CsCl en un volumen de 8 ml (densidad = 1,65)

Para preparar el gradiente de CsCl, 1,5 ml de la solución A fueron pipeteados en un tubo de centrifugación (14 x 89 mm), por encima de esta solución fueron depositados muy cuidadosamente 2 ml de la solución B y finalmente 1,5 ml de la solución C para completar el gradiente. La solución conteniendo los fagos fue depositada muy lentamente sobre la superficie del gradiente. Posteriormente, los tubos conteniendo el gradiente de CsCl y la suspensión de fagos fueron centrifugados utilizando un rotor Beckman (SW41) a 210053 g (35000 rpm) durante 3 hs a 20°C. Luego de la centrifugación, fue verificada la presencia de una banda azul, y la misma fue extraída usando una jeringa de 10 cc. Las muestras obtenidas fueron dializadas (membrana de diálisis Spectra/Por; MWCO = 6-8000 Da) contra buffer P 1X con agitación suave a 4°C, realizando cambios del buffer cada 30 min. Luego de 4 lavados, las muestras fueron incubadas en buffer P durante toda la noche a 4°C con agitación suave.

Luego de esta primera etapa (purificación por gradiente discontinuo), se continuó con la purificación por gradiente continuo de CsCl. Para ello se pesaron 8 g de CsCl, se disolvieron en 5 ml de buffer P y se incorporaron a tubos de centrifuga (16 x 67 mm). La suspensión de fagos obtenidas en la etapa anterior (purificación discontinua) fue agregada sobre la superficie del gradiente. La centrifugación (Beckman, rotor NVT65) fue llevada a cabo a 342317 g (60000 rpm) durante 18 hs a 20°C. Tal como se describiera anteriormente, fue verificada la presencia de una banda azul, y la misma fue extraída usando una jeringa de 10 cc. La muestra conteniendo las partículas fágicas fue dializada (membrana de diálisis Spectra/Por; MWCO = 6-8000 Da) contra buffer P (1X) a 4°C con agitación suave, realizando cambios del buffer cada 30 min. Luego de 4 lavados, las muestras fueron incubadas a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente a la purificación discontinua así como también a la etapa de purificación continua, se realizaron recuentos de partículas fágicas mediante el método de la doble capa agarizada (Sección 3.3).

4.1.5. Identificación de proteínas estructurales

Las proteínas estructurales de las partículas fágicas purificadas fueron identificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Para ello, los fagos purificados (10^{11} UFP/ml) fueron mezclados con el buffer de carga (4X, Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, glicerol 40% v/v, SDS 8% m/v, β -mercaptoetanol 20% v/v, azul de bromofenol 0,1% m/v), sometidos a un tratamiento térmico a 95°C durante 5 min y un proceso de sonicación (Ultrasonic Sonifier W-350 cell disrupter, Branson Sonic Power Co.). Luego, las proteínas fueron separadas por migración en geles con 10% y 12% de poliacrilamida. Las bandas de proteínas fueron detectadas usando azul de Coomassie como colorante, cortadas del gel y conservadas en 100 μ l de agua bidestilada para su posterior análisis. La identificación de las proteínas se realizó mediante Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masa en tándem (LC-MS/MS) en el Centre Protéomique de l'Est du Québec (Québec City, Québec, Canada). Las partículas fágicas completas fueron enviadas también para detección de proteínas que se encuentren en bajos niveles. Los resultados fueron analizados mediante el software Scaffold Proteome (Guglielmotti y col., 2009).

4.2. Microscopia electrónica

Las micrografías de los fagos de colección (B1 y B2) se realizaron en la Unidad de Microscopía del Département de Biologie Medicale, Faculté de Médecine, Université Laval (Québec City, Canada).

Para realizar las observaciones microscópicas, 10 µl de la solución de tinción (2% ácido fosfotungstico, pH 7,0) fueron colocados en una caja de petri estéril. Una grilla de cobre con recubrimiento de carbono (malla Formvar 200, Pelco International) se colocó boca abajo sobre la solución de tinción. Luego de 30 s, 10 µl de la suspensión de fagos (10^9 UFP/ml) fueron mezclados durante 90 s con la solución de tinción contenida en la grilla. Posteriormente las grillas fueron depositadas sobre un papel secante durante 5 min. Las observaciones se realizaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 (Philips, Eindhoven, The Netherlands) operado a 80 kV.

4.3. Viabilidad durante conservación

Se realizó un seguimiento de la viabilidad de las suspensiones fágicas a lo largo de su conservación a 4°C, -20°C y -80°C durante 42 meses. Para las dos últimas temperaturas, el caldo MRS de las suspensiones fágicas fue adicionado de glicerol al 15% v/v (concentración final).

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

4.4. Viabilidad a distintos valores de pH

Para realizar este ensayo, distintas porciones de caldo MRS se ajustaron (en esterilidad) a valores de pH comprendidos entre 2 y 11. Alícuotas de una suspensión fágica stock se adicionaron a los caldos con distintos pH (concentración final aproximada: 10^6 UFP/ml) y se dejaron en contacto por 30 min a 37°C. En paralelo se incubó un control donde el pH original del caldo no fue modificado ($\text{pH } 6,5 \pm 0,2$). Cumplido el tiempo estipulado, se procedió a titular las partículas fágicas viables por el método de la doble capa agarizada. Los resultados se expresaron como porcentajes de los recuentos fágicos iniciales.

4.5. Viabilidad a distintas temperaturas

Las partículas fágicas diluidas en caldo MRS hasta una concentración final de aproximadamente 10^6 UFP/ml fueron distribuidas en tubos Eppendorf en un volumen final de

1 ml. Los tubos fueron incubados a distintas temperaturas (0°C, 14°C, 37°C y 50°C) durante 30 min y la concentración de los fagos luego del tratamiento fue evaluada por el método de la doble capa agarizada. Los resultados se expresaron como porcentajes de los recuentos fágicos iniciales.

5. Interacción de *Lactobacillus plantarum* con sus fagos específicos

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

5.1.1. Lisis en medio líquido

Para estudiar la influencia de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la lisis celular, se inocularon 50 μl de un cultivo de 16-18 hs de la cepa sensible (*Lb. plantarum* ATCC 8014) en 5 ml de caldo MRS, con y sin CaCl_2 (10 mM) ó MgCl_2 (10 mM), y se agregó 0,1 ml de un filtrado de alto título del fago (m.o.i. = 0,5). Luego de una agitación suave, los tubos fueron incubados a 37°C. Para monitorear el desarrollo normal del cultivo, paralelamente, se incubaron tubos control de la cepa bacteriana sin infectar.

El ensayo consistió en el seguimiento, en forma visual, del desarrollo del cultivo infectado por un período de tiempo tal que permita un buen crecimiento de la cepa en el tubo control, detectando la ocurrencia o no de lisis del cultivo, en presencia o ausencia de los cationes ensayados. Los tubos en los que no se observó lisis, se repicaron por dos días sucesivos, partiendo de los tubos correspondientes del día anterior y continuando con el monitoreo visual.

5.1.2. Formación de placas de lisis en medio sólido

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

En la comparación se analizó la morfología de las placas de lisis (diámetro, definición, bordes, forma) así como también el recuento de partículas fágicas (título) obtenido. La eficiencia de plaqueo, con relación a los recuentos obtenidos en presencia de calcio, fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

5.2. Determinación del espectro de hospedadores

Con el objeto de conocer el espectro de cepas sensibles para los fagos B1, B2, FAGK1 y FAGK2, se emplearon las cepas que se indican en la Tabla 3 y se aplicaron dos metodologías: test de turbidez y spot test (Svensson y Christiansson, 1991).

Para llevar a cabo el test de turbidez, alícuotas de 200 μ l de cada filtrado fágico fueron agregadas a tubos conteniendo 5 ml de caldo MRS-Ca y adicionados de 50 μ l de cultivo desarrollado de la cepa a ensayar (m.o.i. = 0,25). Una cepa se considera sensible si el cultivo lisa como máximo en el tercer repique de sensibilidad, de lo contrario se considera resistente al fago en cuestión. Debido a que se parte de una suspensión de fagos de alto título, si la lisis se produce en el segundo o tercer repique podría ser indicador de algún grado de resistencia al fago por parte de la cepa.

Para los ensayos en medio agarizado (spot test), en un cuadrante de Cajas de Petri estériles conteniendo una base de agar MRS-Ca-Gli se agregó una mezcla de 0,1 ml de la suspensión celular de interés (50 μ l de un cultivo desarrollado por 16-18 hs diluido en 5 ml de caldo MRS fresco), CaCl_2 50 mM y 1 ml de MRS soft agar. Luego, las placas se dejaron secar durante 30 minutos (en gabinete de flujo laminar horizontal CASIBA) y se agregó una gota (20 μ l) de la suspensión fágica en estudio. Una vez que las gotas fueron absorbidas, las placas se incubaron en microaerofilia a 34°C durante 16-18 hs. Una cepa se considera sensible al fago ensayado si, en el sitio donde se depositó la gota, aparece una zona de inhibición (zona de lisis).

5.3. Ciclos de multiplicación fágica (Burst size)

Se preparó un cultivo de la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014, por incubación a 37°C en caldo MRS, hasta una turbidez adecuada ($\text{D.O.}_{560\text{nm}} = 0,5$). Las células fueron cosechadas por centrifugación y el pellet se resuspendió en caldo MRS-Ca (1/5 del volumen inicial). Luego, 1 ml de la suspensión bacteriana conteniendo CaCl_2 10 mM se infectó con el fago (m.o.i. de 0,5 para fagos B1 y B2 y de 0,6 para fagos FAGK1 y FAGK2) y se incubó por 5 min (fagos B1 y B2) o 30 min (fagos FAGK1 y FAGK2) a 37°C en baño termostático. De este modo se logra una adsorción superior al 90% de las partículas fágicas sobre los receptores bacterianos. A continuación, la mezcla fue centrifugada por 1 min a 12000 g. El pellet se resuspendió muy cuidadosamente en 1 ml de caldo MRS-Ca. Posteriormente, el pellet (1 ml) fue transferido a un tubo conteniendo 9 ml de caldo MRS-Ca. A partir de esta suspensión se efectuaron diluciones decimales en caldo MRS-Ca. Estas diluciones se hacen para evitar la readsorción de las partículas fágicas liberadas, que pudieran de esta manera iniciar nuevos ciclos de

multiplicación simultáneos, induciendo a error en la determinación del burst size. Los tubos fueron incubados a 37°C en baño de agua termostatzado, y a intervalos regulares de tiempo, se extrajeron alícuotas (100 µl) que fueron inmediatamente tituladas sobre la cepa sensible, para conocer el número de partículas fágicas libres (Chow y col., 1988).

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

5.4. Caracterización de la adsorción

La cepa bacteriana en estudio fue desarrollada en caldo MRS a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial temprana ($D.O_{560nm} = 0,5$), cosechándose luego las células por centrifugación (10 min, 4500 g). Luego de descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en caldo fresco, en la mitad del volumen original. Cada cultivo se infectó con el fago correspondiente (m.o.i. = 0,04 - 0,05) en tubos Eppendorf y se incubaron a 37°C en baño de agua termostatzado. A tiempos predeterminados se retiraron los tubos y se centrifugaron (12000 g, 5 min, 5°C) con el objeto de separar los fagos libres. Inmediatamente, se extrajeron alícuotas de los sobrenadantes y se titularon sobre la cepa sensible (método de la doble capa agarizada) para conocer la concentración de fagos libres.

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

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

Donde T_i : título inicial de fagos (UFP/ml) puestos en contacto con la cepa

T_f : título de fagos (UFP/ml) libres en el sobrenadante (no adsorbidos)

Para los estudios de adsorción se conformaron 20 sistemas fago/cepa, los cuales se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Sistemas fago/cepa utilizados para llevar a cabo los estudios de adsorción.

Fago	Cepa
B1	<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014
B2	
FAGK1	
FAGK2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> WCSF1
B2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> LMG9211
B2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> PLN
B2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> SMQ-1112
B2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> SMQ-1113
B2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> SMQ-1114
B2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> SMQ-1115
B2	
B1	<i>Lb. plantarum</i> SMQ-1116
B2	

Para todos los sistemas ensayados se utilizó la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 para titular las partículas fágicas no adsorbidas. La influencia de factores ambientales y fisiológicos sobre la adsorción (que se detalla a continuación) sólo se llevó a cabo para los cuatro fagos (B1, B2, FAGK1, FAGK2) con la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014.

5.4.1. Adsorción del fago B1 sobre *Lactobacillus plantarum* WCSF1 y LMG9211

Debido a que los valores de adsorción obtenidos para los sistemas *Lb. plantarum* WCSF1/ Φ B1 y *Lb. plantarum* LMG9211/ Φ B1 con la técnica descrita anteriormente fueron bajos, los ensayos fueron modificados como se describe a continuación.

Como consecuencia de que los experimentos se extendieron por tiempos prolongados, el cultivo de la cepa sensible con un valor de D.O._{560nm} de 0,5 fue centrifugado y resuspendido en buffer TMG (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, MgSO₄ 10 mM y gelatina 0,1% m/v) con el objeto de evitar que prosiga su desarrollo y así la propagación del fago. Las suspensiones celulares en buffer TMG adicionadas de CaCl₂ (10 mM), fueron infectadas con el fago B1 (m.o.i. = 0,04 - 0,05) e incubadas a 37°C durante 5 hs. A intervalos de tiempo preestablecidos, los tubos fueron centrifugados y la concentración de partículas fágicas en el sobrenadante fue determinada mediante el método de la doble capa agarizada. Los resultados se expresaron como porcentaje de partículas fágicas (en relación a los recuentos iniciales) en el sobrenadante en función del tiempo.

5.4.2. Influencia del calcio

Se procedió como en un ensayo de adsorción típico, pero en este caso se utilizaron dos alícuotas de las células en suspensión, a una de las cuales se le adicionó calcio (10 mM) y a la otra, no. Se realizaron recuentos de partículas fágicas a 5, 15, 30 y 45 min. Las cinéticas de adsorción se obtuvieron graficando el porcentaje (con relación a los recuentos iniciales) de fagos presentes en el sobrenadante (fagos no adsorbidos) en función del tiempo, para ambas condiciones (con y sin Ca²⁺).

5.4.3. Influencia de la temperatura

Para estudiar la dependencia de la adsorción con la temperatura de incubación, se utilizó la técnica de adsorción ya descrita, agregando CaCl₂ (10 mM) al medio, y respetando las demás condiciones de reacción (Quiberoni, 1997). Se estableció un tiempo de adsorción de 30 min, realizando el estudio a las temperaturas de 0°C, 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 42°C y 50°C. Cumplido el plazo de las incubaciones, se procedió a centrifugar los tubos Eppendorf y se operó tal como se indicara antes.

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

Con el objetivo de conocer si la viabilidad de la cepa era afectada por la temperatura, alícuotas (1 ml) de la suspensión celular preparada realizando una dilución decimal de un

cultivo overnight, fueron incubadas a 37°C y 50°C durante 30 min. Luego del ensayo, se realizaron recuentos celulares (en MRS agarizado) y se compararon con los valores obtenidos inicialmente.

5.4.4. Influencia del pH

El efecto de este parámetro sobre la adsorción se estudió empleando caldo MRS a diferentes valores de pH, ajustado post esterilización con soluciones concentradas de NaOH o HCl. Se utilizó la técnica de adsorción ya descrita, agregando CaCl₂ (10 mM) al medio y respetando las demás condiciones de reacción. Se eligieron aquellos valores de pH para los cuales no se produjo una importante pérdida de viabilidad, considerando los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad fágica a distintos pH (a 37°C) (Sección 4.4). Los valores de pH estudiados fueron 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Las suspensiones celulares infectadas se incubaron 30 min a 37°C y luego se procedió a centrifugar los tubos Eppendorf, operándose como se indicara en 5.4.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de adsorción a 30 min, para los distintos pH ensayados.

Se monitoreó la viabilidad de la cepa en caldo MRS ajustado a distintos valores de pH. Para ello, se preparó la suspensión celular tal como se indicara previamente para los ensayos de adsorción, pero la resuspensión se realizó en caldo MRS-Ca a pH 5, 8, 9 y 10, así como también en caldo MRS sin ajuste de pH, a modo de control. Las suspensiones se incubaron a 37°C, en baño termostatzado, durante 30 min. Cumplido ese tiempo, se realizaron inmediatamente recuentos celulares en agar MRS, que fueron incubados a 37°C por 48 hs.

5.4.5. Influencia de un tratamiento térmico sobre las células

Se analizó el efecto de un tratamiento térmico aplicado a las células bacterianas sensibles, sobre la adsorción de los fagos a sus receptores. Para ello se utilizó un cultivo obtenido tal como se explicara en el punto 5.4, el cual, luego de ser resuspendido en la mitad de su volumen en caldo MRS, fue sometido a un calentamiento (100°C, 2 min), a fin de producir la muerte de todas las células. La pérdida de viabilidad de los cultivos fue controlada inoculando (6%) la suspensión celular tratada en caldo MRS, incubando por 48-72 hs a 37°C y monitoreando la presencia o no de turbidez, debido al desarrollo de las células bacterianas. En medio agarizado, la viabilidad se evaluó por estriado del cultivo tratado en placas de agar MRS, las cuales se incubaron por 48-72 hs a 37°C y luego se observaron para detectar eventuales colonias desarrolladas.

Posteriormente al tratamiento térmico, se procedió al agregado de CaCl_2 (10 mM) a la suspensión celular.

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

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

5.4.6. Influencia del estado fisiológico celular

En una primera etapa, fue determinada la mínima concentración de cloranfenicol (Elea, Buenos Aires, Argentina) necesaria para inhibir la síntesis de proteínas en *Lb. plantarum* ATCC 8014. Para ello, el cultivo en fase exponencial de crecimiento ($\text{D.O.}_{560\text{nm}} = 0,5$) fue centrifugado y resuspendido (1×10^8 - 2×10^8 UFC/ml) en caldo MRS con 20 $\mu\text{g/ml}$ o 100 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (diluido en agua destilada estéril), luego distribuido en tubos Eppendorf (1ml) que se incubaron a 37°C durante 120 min. Un cultivo con el mismo tratamiento pero sin el agregado del antibiótico fue usado como cultivo control. A intervalos de tiempo regulares, se realizaron recuentos celulares y se midió la $\text{D.O.}_{560\text{nm}}$.

La concentración de cloranfenicol elegida para llevar a cabo los experimentos de adsorción fue la mínima concentración que produjo valores estables en la densidad óptica así como también en los recuentos celulares durante el tiempo de incubación.

Adicionalmente, se evaluó si el efecto de inhibición del antibiótico se mantenía luego de su remoción. Para ello, cultivos con el mismo tratamiento que el descrito anteriormente fueron incubados a 37°C hasta lograr la inhibición de la síntesis de proteínas (la cual fue lograda luego de 75 min de tratamiento). Posteriormente, las células fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en caldo MRS-Ca y finalmente incubadas a 37°C . A determinados intervalos de tiempo, se midió la densidad óptica ($\text{D.O.}_{560\text{nm}}$).

Sobre la base de los resultados obtenidos con todos los ensayos previos, el experimento de adsorción se llevó a cabo sobre la cepa hospedadora *Lb. plantarum* ATCC 8014 tratada con una concentración de cloranfenicol de 20 $\mu\text{g/ml}$. El antibiótico fue removido luego de que la inhibición en la síntesis de proteínas fue lograda (75 min). Posteriormente, las células fueron infectadas con el fago correspondiente ($\text{m.o.i} = 0,04$ - $0,05$) e incubadas a 37°C durante 30 min. La concentración de partículas fágicas fue determinada como se indicara en el

punto 5.4. Un cultivo celular con similar tratamiento pero sin el agregado del antibiótico fue utilizado como cultivo control.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de la adsorción a los 30 min y comparados con los valores obtenidos para el cultivo control.

5.5. Evidencia de sistemas de Restricción/Modificación en *Lactobacillus plantarum*

Para las cepas que resultaron sensibles al ataque fágico, se determinó la eficiencia de plaqueo, definida como la relación entre el título del fago en estudio sobre la correspondiente cepa sensible y el obtenido sobre *Lb. plantarum* ATCC 8014.

Para los sistemas que presentaron valores de EOP reducidos, se estudió la presencia de mecanismos de fagoresistencia del tipo Restricción/Modificación (R/M) de acuerdo a lo descrito por Binetti y col. (2007b) con las siguientes modificaciones: la suspensión fágica fue titulada sobre la cepa hospedadora (*Lb. plantarum* ATCC 8014) y sobre la cepa restrictiva correspondiente (*Lb. plantarum* WCSF1 o LMG9211), siendo luego calculado el valor de EOP (primer pasaje). Se tomaron dos placas de lisis provenientes de la titulación sobre la cepa restrictiva y se resuspendieron en dos tubos con 5 ml de caldo MRS-Ca. Estas suspensiones fueron conservadas a 4°C durante 24 hs para permitir la difusión de las partículas fágicas al medio líquido. Luego se inoculó con 200 µl de un cultivo overnight de la cepa restrictiva para lograr la propagación de las partículas fágicas (fago modificado, denominado “m”). Los tubos fueron incubados a 37°C hasta lisis completa del cultivo. El lisado obtenido fue filtrado y titulado sobre ambas cepas (hospedadora y restrictiva) a fines de determinar el valor de EOP correspondiente a esta etapa (segundo pasaje). En presencia de sistemas R/M, dicho valor debe resultar cercano a la unidad. Para probar la reversibilidad de la modificación, se levantaron dos placas de lisis a partir del recuento sobre la cepa restrictiva, procediendo del mismo modo que para la etapa anterior, excepto que la suspensión fágica se inoculó con la cepa hospedadora *Lb. plantarum* ATCC 8014 (tercer pasaje). De esta manera, el fago se propagaría normalmente sobre la cepa hospedadora, perdiendo la modificación (fago denominado “m-d”). El filtrado obtenido, al ser titulado sobre ambas cepas, debería evidenciar una reducción en el valor de EOP, resultando similar al obtenido en el primer pasaje, confirmándose de este modo la presencia de mecanismos R/M en las cepas restrictivas.

5.6. Estudio sobre paredes celulares

5.6.1. Preparación de las paredes celulares

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

A partir de un cultivo incubado durante 16-18 hs de *Lb. plantarum* ATCC 8014, fueron inoculados (2%) 500 ml de caldo MRS e incubados a 37°C hasta alcanzar una $D.O_{560nm} = 0,5 - 0,8$. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 5000 g durante 10 min. Luego de separar el sobrenadante, se realizaron dos lavados del pellet en 1/10 del volumen inicial con buffer fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 10 mM, pH 6,8), centrifugando luego de cada lavado 15 min a 5000 g. Se resuspendieron las células en buffer fosfato (1/10 del volumen inicial) y 25 ml de la suspensión celular fueron colocados en tubos FALCON (de 50 ml de capacidad), agregando 10 g de perlas de vidrio estériles (diámetro 0,10 - 0,15 mm) a 4°C. Esta proporción células/perlas de vidrio aseguró un suficiente espacio de cabeza (1/3) para que la rotura fuera eficaz (Ranhand, 1974; Callegari, 1992). Se realizó el recuento bacteriano de esta suspensión (recuento inicial) y una observación directa al microscopio óptico. Este recuento así como los siguientes, fueron realizados por una microtécnica (que se detalla hacia el final de esta metodología), debido a que un recuento tradicional en superficie o en profundidad hubiera consumido volúmenes de células demasiado importantes.

La disrupción celular fue realizada por agitación mecánica en Vortex durante 3,5 hs, enfriando alternadamente en baño de hielo cada 30 seg. La efectividad de la rotura de las células bacterianas fue seguida por microscopía óptica y confirmada por micro recuento en placa (recuento final).

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

Las células enteras y demás detritus celulares fueron separados de las paredes por centrifugación a 3500 g, durante 15 min y la efectividad de la centrifugación en la separación de células enteras y detritus de las paredes fue confirmada mediante un recuento celular en el sobrenadante. El pellet obtenido fue descartado y el sobrenadante, conteniendo las paredes celulares, fue centrifugado a 12000 g durante 15 min (4°C), con el objetivo de recolectar las paredes crudas.

Sobre las paredes crudas se aplicó un tratamiento enzimático con el fin de eliminar los restos del contenido citoplasmático y, de esta manera, obtener las paredes limpias. Para ello,

se resuspendieron las paredes en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), y se trataron con DNAsa (0,10 mg/ml) y RNAsa (0,15 mg/ml) (ambas soluciones se prepararon en agua bidestilada estéril), incubando 30 min en baño de agua a 37°C. El pellet obtenido (12000 g, 15 min, 4°C) fue lavado 8 veces con buffer fosfato (10 mM, pH 6,8), centrifugado a 12000 g (2 min, 5°C), descartando el sobrenadante luego de cada lavado. El objetivo fue eliminar los restos de citoplasma y enzimas contenidos en las preparaciones de paredes. Una vez finalizado este tratamiento se obtuvieron las paredes celulares puras que, luego de ser concentradas por centrifugación a 12000 g durante 15 min (4°C), se almacenaron a -20°C (Quiberoni y col., 2000).

5.6.2. Microtécnica de recuento bacteriano en placa

Se empleó agua de peptona (0,1%) para realizar las diluciones decimales de la muestra. En una caja de Petri dividida en cuartos, se dispuso una base de agar MRS. Sobre cada cuadrante, se volcó una mezcla de 100 µl de la dilución de la muestra y 1 ml de soft agar MRS. Se incubó a 37°C por 48 hs y se realizaron los recuentos de las UFC/ml considerando para el cálculo, el factor de dilución correspondiente.

5.6.3. Calibración de las paredes celulares

Se realizó para conocer la cantidad de paredes celulares a utilizar en los ensayos que siguen, de modo que se cumpla con la condición de adsorber al menos el 90% de las partículas fágicas, cuando se trabaja con una concentración aproximada de 10⁶ UFP/ml (Valyasevi y col., 1990; Callegari, 1992).

Para ello, se resuspendió el pellet de paredes celulares puras en 1 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) con adición de CaCl₂ para lograr una concentración final de 10 mM (Tris-HCl-Ca) y se realizaron diluciones decimales seriadas. Se infectó cada dilución con una suspensión fágica, de modo que la concentración final resultara de aproximadamente 10⁶ UFP/ml, y se incubaron en baño termostático a 37°C por 30 min, junto con un control de fago en Tris-HCl-Ca. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron los Eppendorf a 12000 g por 15 min (4°C) y se titularon los fagos libres presentes en el sobrenadante. Para cada dilución ensayada, se calculó el porcentaje de adsorción teniendo en cuenta el título de fagos iniciales agregados (control de fagos).

5.6.4. Tratamientos selectivos sobre paredes celulares

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

➤ **Mutanolisina** (50 U/ml en agua bidestilada estéril): 30 min a 37°C . Transcurrido ese tiempo se inactivó la enzima colocando los tubos a 100°C durante 3 min y enfriando rápidamente en baño de hielo.

➤ **Proteinasa K** (0,1 mg/ml en agua bidestilada estéril): 30 min a 37°C , sumergiendo luego en baño de hielo para detener la reacción.

➤ **SDS** (1 %): 30 min a 37°C , sumergiendo luego en baño de hielo para detener la reacción.

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

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

Luego de completarse los tratamientos individuales, las paredes tratadas y las paredes control fueron lavadas 5 veces con buffer fosfato (10 mM, pH 6,8), centrifugando a 12000 g durante 10 min y descartando el sobrenadante luego de cada lavado. Finalizados los lavados, los pellets de las paredes fueron resuspendidos en Tris-HCl, en los volúmenes iniciales correspondientes, y se congelaron a -20°C para ser usadas luego en los ensayos de adsorción.

5.6.5. Ensayos de adsorción

Las paredes tratadas y el control de paredes sin tratar se utilizaron sin ser diluidas ya que sólo en esta condición se obtuvo una adsorción mayor al 90%. Las paredes resuspendidas en Tris-HCl fueron retiradas del freezer (-20°C), se les adicionó CaCl_2 (10 mM) y 0,1 ml de una dilución del fago, para que la concentración en el medio de reacción sea de 10^6 UFP/ml. Se incubó 30 min a 37°C en baño de agua, y luego de este tiempo se centrifugó 5 min a 12000 g. El sobrenadante fue titulado por el método de la doble capa agarizada, y el porcentaje de fagos adsorbidos fue calculado de la siguiente manera:

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

Donde T_i : título inicial de fagos (UFP/ml) puestos en contacto con las paredes celulares de la cepa sensible.

T_f : título de fagos (UFP/ml) libres en el sobrenadante (no adsorbidos sobre las paredes celulares).

5.6.6. Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas

Luego de titular las partículas fágicas (UFP/ml) remanentes en el control (paredes puras) del ensayo de adsorción (Sección 5.6.5), se descartó el sobrenadante, el cual contenía los fagos no adsorbidos. El pellet libre del sobrenadante, que contenía las paredes con las partículas fágicas adsorbidas, se resuspendió en 1 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH= 7,5) y se incubó a 37°C. A distintos intervalos de tiempo se titularon las UFP/ml libres. De esta manera, se obtuvo una primera aproximación del grado de reversibilidad de la unión fago-receptor de pared (Valyasevi y col., 1990; Callegari, 1992).

Los resultados fueron expresados como Log UFP/ml libres en el sobrenadante a diferentes tiempos.

5.6.7. Ensayo de neutralización fágica con monosacáridos

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

Alícuotas de 0,9 ml de la solución del monosacárido a testear, usando como diluyente Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y con el agregado de CaCl_2 (10 mM) (Valyasevi y col., 1990), fueron adicionadas de 0,1 ml de la suspensión fágica (concentración final 10^6 UFP/ml). La concentración de monosacáridos utilizada fue de 500 mM. Luego de 30 min de incubación a 37°C, se titularon las partículas fágicas libres por medio del método de la doble capa agarizada. El porcentaje de inhibición fue calculado considerando el número de UFP/ml adicionado a tiempo cero (T_i), y el número de UFP/ml libres luego de los 30 min de incubación (T_f):

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

5.6.8. Ensayos de competencia y desorción con monosacáridos en la adsorción de los fagos sobre *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

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

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

Los recuentos alcanzados en los dos tipos de ensayos se comparan contra los obtenidos para la adsorción de fagos sobre las células bacterianas sin el agregado de monosacáridos (control).

Los ensayos de competencia entre los azúcares y los receptores, por parte de los fagos, se llevaron a cabo como se describe a continuación. El cultivo bacteriano desarrollado en caldo MRS a 37°C ($D.O_{560nm} = 0,5$) fue centrifugado (10 min, 4500 g) y el pellet resuspendido con Tris-HCl en el mismo volumen, realizando luego un lavado de las células en iguales condiciones. Finalmente el pellet fue resuspendido en $\frac{1}{4}$ del volumen inicial utilizando Tris-HCl como diluyente. La suspensión celular conteniendo $CaCl_2$ (10 mM) fue adicionada de D-galactosa, de D-ribosa o fructosa (concentración final de 250 mM), infectada con el fago (m.o.i. = 0,04 - 0,05) e incubada a 37°C. A intervalos de tiempo preestablecidos (5 y 180 min) se cuantificaron las partículas fágicas presentes en el sobrenadante mediante el método de la doble capa agarizada. Se determinó el valor de adsorción teniendo en cuenta el recuento inicial de partículas fágicas y los resultados se compararon con los obtenidos por el cultivo control (sin agregado de azúcares).

Para los ensayos de desorción, la suspensión celular fue preparada de igual manera que para los ensayos de competencia, sólo que el pellet fue resuspendido en la mitad del volumen inicial usando Tris-HCl como diluyente. Las adsorciones se llevaron a cabo en un volumen final de 600 μ l y con una m.o.i de 0,04 - 0,05. Cumplidos los 30 min de incubación a 37°C, los tubos Eppendorf se homogeneizaron con suavidad e inmediatamente se alicuotaron en otros 3 nuevos tubos Eppendorf con un volumen de 200 μ l cada uno. Uno de los tubos se centrifugó (13000 g, 5 min, 4°C) y su sobrenadante se tituló para obtener los valores de adsorción control a 30 min. A los otros 2 tubos Eppendorf, se les adicionaron 200 μ l de una solución (en Tris-HCl) de D-galactosa, de D-ribosa (500 mM), y se incubaron a 37°C. Uno de los tubos se retiró a los 5 min y su sobrenadante se tituló inmediatamente, mientras que el restante se retiró a los 60 min, procediéndose de igual modo. Por comparación con los valores de adsorción a 30 min, se obtuvo información del efecto que presentan cada uno de los dos hidratos de carbono en la desorción de los fagos adsorbidos sobre la superficie celular, a ambos tiempos.

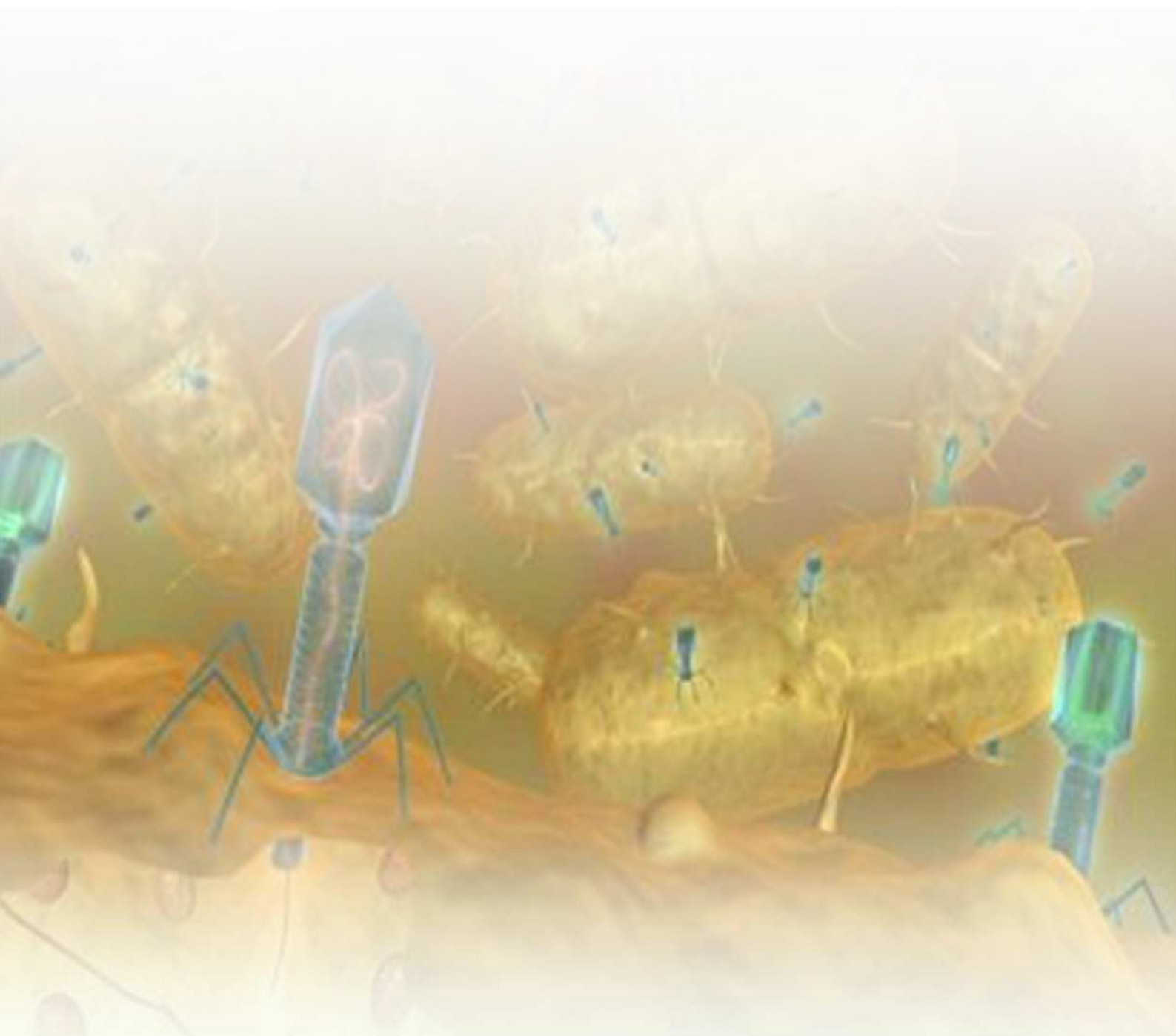
5.6.9. Ensayos con lectinas

Con el objetivo de identificar azúcares involucrados en los receptores fágicos de *Lb. plantarum* ATCC 8014, fueron utilizadas lectinas de *Arachis hypogaea* (específica de β -galactosa, N-acetil- α -D-galactosamina), *Wisteria floribunda* (N-acetil- α -D-galactosamina) así como también concanavalina A (ConA) (α -D-glucosa). Las mismas fueron disueltas hasta una concentración final de 1 mg/ml en Tris-HCl (50 mM, pH 6,91) y esterilizadas por filtración.

La puesta a punto de la técnica fue realizada con el fago PL-1 y su cepa sensible *Lb. casei* ATCC 27092 teniendo en cuenta los resultados previos de Ishibashi y col. (1982).

La cepa bacteriana en estudio fue desarrollada en caldo MRS a 37°C hasta alcanzar una $D.O._{560\text{ nm}} = 0,5$, luego las células fueron cosechadas por centrifugación (4500 g, 5 min) y resuspendidas en $\frac{1}{4}$ del volumen inicial. En tubos Eppendorf conteniendo la suspensión de células con CaCl_2 (10 mM), fue adicionada la lectina correspondiente. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 15 min. Cumplido el tiempo de incubación, el fago en estudio fue agregado tal que la concentración final del mismo fuera de 10^6 UFP/ml, siendo los tubos incubados nuevamente durante 15 min. Luego de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 12000 g durante 5 min y los fagos no adsorbidos fueron cuantificados mediante el método de la doble capa agarizada. Un control (sin agregado de lectinas) fue utilizado a fines de determinar el número de fagos adsorbidos a la célula bacteriana.

RESULTADOS



RESULTADOS

1. Caracterización de bacteriofagos

1.1. Caracterización molecular

1.1.1. Perfiles de restricción

Los perfiles de restricción obtenidos con las enzimas *EcoRV*, *HindIII*, *MluI* y *SalI* mostraron diferencias entre los fagos B1 y B2, confirmando que se trata de fagos diferentes (Figura 21).

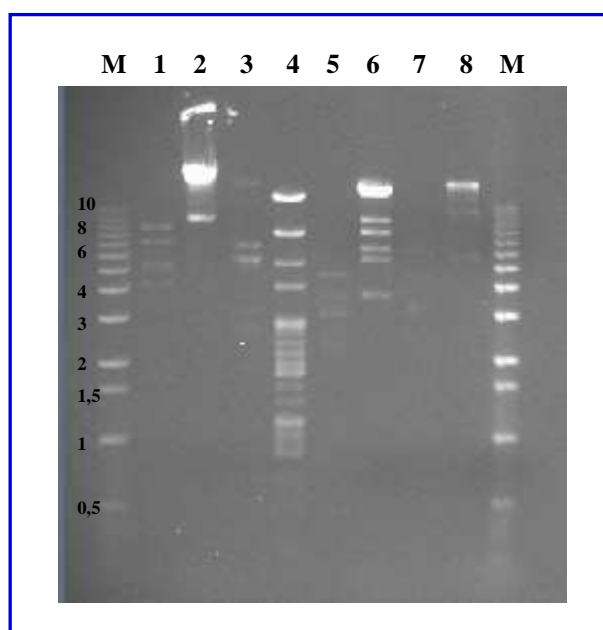


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa (0,8% m/v) de los fragmentos de ADN de los fagos B1 (1, 3, 5 y 7) y B2 (2, 4, 6 y 8) generados con *EcoRV* (calles 1 y 2), *HindIII* (calles 3 y 4), *MluI* (calles 5 y 6) y *SalI* (calles 7 y 8). Calles M, Marcador de Peso Molecular (1 kb DNA ladder).

1.1.2. Secuenciamiento del genoma fágico

A través del secuenciamiento de los genomas de los fagos B1 y B2, se determinó el peso molecular de los mismos así como también su contenido de GC. El tamaño del genoma del fago B1 fue de 38,0 kb mientras que el del fago B2 correspondió a 80,6 kb. El contenido de GC fue de 47,6% y 36,9%, respectivamente.

Por otro lado, a través del análisis de las secuencias se observó que el fago B1 presenta un mecanismo de empaquetamiento del ADN genómico del tipo *pac* mientras que para el fago B2 es del tipo *cos* y el extremo cohesivo presenta un tamaño de 11 bp.

El análisis bioinformático (ORF Finder y GeneMark) del genoma del fago B1 reveló la presencia de 60 ORFs, los cuales estuvieron orientados en la misma dirección. Los codones de inicio correspondieron a ATG (90%), GTG (5%) y ATT (5%). Por comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas con las almacenadas en la base de datos (GenBank), 23 ORFs (38%) mostraron homología con genes previamente caracterizados. En la mayoría de

los casos, las homologías se correspondieron con fagos que infectan a bacterias lácticas, en particular a *Lb. plantarum* (fago JL-1). Adicionalmente, 9 ORFs mostraron homología con genes cuya función, hasta el momento, es desconocida.

Con respecto al fago B2, se detectaron 127 ORFs, los cuales se agruparon en clusters orientados en distintas direcciones. Para este fago, los codones de inicio fueron ATG (86%), TTG (5%), GTG (5%), ATT (2%) y ATA (2%). Un total de 36 (28%) ORFs mostraron homologías con secuencias almacenadas en bases de datos, a las cuales, previamente, se les había asignado una función proteica determinada. Por otro lado, 30 ORFs evidenciaron similitudes con genes cuya función, hasta el momento, es desconocida. Las similitudes correspondieron, principalmente, a bacterias Gram positivas y sus fagos.

Adicionalmente, para el fago B2 se identificaron 6 ARNt, los cuales codifican para los aminoácidos Asparagina (Asn), Leucina (Leu), Metionina (Met), Glicina (Gly) y Arginina (Arg). Entre los codones asociados a cada ARNt, aquellos que fueron encontrados asociados a los ARNt del fago B2 (**AAC** para Asn, **CTA** para Leu, **ATG** para Met, **GGA** para Gly, **AGA** y **AGG** para Arg) no siempre correspondieron a los más utilizados por dicho fago (Tabla 5). Esta situación puede observarse, por ejemplo, para el aminoácido Leu, para el cual la frecuencia de utilización del codón asociado al ARNt (CTA) fue de 21,09% mientras que el codón más utilizado (42,45%) relacionado al mismo aminoácido, fue TTA. Con respecto a los aminoácidos Asn y Gly, la diferencia no fue tan marcada. En estos casos, los codones asociados a los ARNt del fago B2, fueron levemente menos utilizados que otros que codifican para los mismos aminoácidos. Por el contrario, para el aminoácido Arg, los codones más utilizados correspondieron a aquellos asociados a los ARNt del fago B2 (AGA y AGG) (Tabla 5).

Debido a que hasta el momento no se han secuenciado cepas sensibles al fago B2, no fue posible comparar la frecuencia de utilización de codones por parte de dicho fago con la de alguna cepa sensible a él. Es por ello que se analizaron las secuencias de las cepas de *Lb. plantarum* presentes en la base de datos de Kazusa del DNA Research Institute. En general, los codones codificados en el genoma fágico correspondientes a los diversos ARNt del fago B2 evidenciaron una mayor frecuencia de utilización por parte del fago B2 en comparación a los valores obtenidos para las 4 cepas (Tabla 5). Esta situación se puede observar claramente para el codon AGA (aminoácido Arg), el cual es usado, por el fago, a una frecuencia de 20,68% mientras que los valores obtenidos para las cepas bacterianas estuvieron comprendidos entre 0-1,7%. Sin embargo, el codón GGA (aminoácido Gly) evidenció un comportamiento diferente, siendo más utilizado por las cepas que por el fago B2.

Tabla 5. Frecuencia de utilización de codones para cepas de *Lb. plantarum* y el fago B2.

Aminoácido	Anticodon	Codon	Frecuencia de utilización del codón (%)				
			Cepas				Fago B2
			<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i> WCSF1	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	
Asn	GTT	AAC	17,3	17,5	13,1	12,8	19,26
		AAT	30,1	26,6	21,0	19,9	25,94
Leu	TAG	CTA	12,6	11,5	7,9	9,7	21,09
		TTA	37,4	33,4	21,0	31,7	42,45
		TTG	25,2	25,3	21,0	25,2	40,96
		CTT	11,0	8,9	5,2	5,2	13,56
		CTC	6,4	8,7	13,1	7,1	5,34
		CTG	9,9	12,3	2,6	10,0	21,85
		Met	CAT	ATG	27,2	26,1	23,6
Gly	TCC	GGA	11,2	10,0	10,5	13,1	8,5
		GGT	27,1	26,4	63,0	29,1	12,38
		GGC	15,0	17,3	18,4	21,0	5,3
		GGG	11,9	12,3	10,5	14,2	6,8
Arg	TCT	AGA	4,4	1,7	0	0,3	20,68
		CCT	1,7	0,8	0	0	11,33
	CGT	12,1	11,7	23,6	12,1	8,74	
	CGC	7,0	8,8	2,6	10,2	4,05	
	CGA	7,2	7,1	0,0	6,8	6,64	
	CGG	10,9	12,9	23,6	16,3	7,08	

Los codones indicados en **negrita** son aquellos codificados por los ARNs en el genoma del fago B2.

Análisis del genoma del fago B1

El fago B1 presentó elevada homología con el fago JL-1, no sólo en el ordenamiento de los genes sino también en el tamaño y punto isoeléctrico de algunas proteínas estructurales con la misma función. Los ORFs deducidos en el genoma del fago B1 así como también sus funciones proteicas putativas se detallan en la Tabla 6.

Genes involucrados en el empaquetamiento del ADN fágico

Los ORFs 1 y 2 presentaron similitudes con la subunidad menor y mayor de la terminasa de los fagos g1e y JL-1 (*Lb. plantarum*), respectivamente. Esto sugiere que ambos genes participarían en el empaquetamiento del ADN fágico. En los fagos con cola, la subunidad menor es responsable de la unión del ADN y la subunidad mayor interviene en el clivaje del ADN fágico, el cual dependerá del tipo de empaquetamiento (Lu y col., 2005). En general, la subunidad mayor de la terminasa provee la enzima endonucleasa y la ATPasa para el empaquetamiento (Durmaz y col., 2008). Los genes que codifican para las terminasas están localizados dentro o cerca de los genes estructurales (Lu y col., 2005), lo cual puede evidenciarse para el fago B1.

Por otro lado, el ORF59 evidenció homología con la endodeoxirribonucleasa del fago AT3 (*Lb. casei*). Por la ubicación en el genoma de fago B1, podría participar en el empaquetamiento del ADN. Sin embargo, esta proteína en el genoma del fago JL-1 estaría vinculada a la etapa de síntesis y replicación del ADN (Lu y col., 2005).

Genes involucrados en la replicación del ADN

El gen ORF24 mostró homología con una endonucleasa del fago JL-1. Cercano a este gen se encuentra el ORF26 cuyo producto proteico derivado muestra similitud con la helicasa (NTP-binding) del mismo fago. Adicionalmente, la función de helicasa fue atribuida al ORF37 considerando las homologías encontradas con el ORF467 del fago JL-1. Estos genes participarían en la síntesis de ADN fágico.

Por otro lado, la secuencia del ORF27 evidenció similitudes con la ADN primasa del fago JL-1. Además, por homología con el genoma del fago JL-1 así como también por la similitudes en el tamaño de la proteína y punto isoeléctrico, se puede asignar la función de replicasa al ORF34 (Lu y col., 2005). Ambas proteínas serían necesarias para la replicación del ADN fágico.

El ORF31 del genoma del fago B1 evidenció homología con la enzima endonucleasa del fago Lmr1 (*Lactobacillus*). Adicionalmente, por comparación con las secuencias almacenadas en la base de datos de GenBank (Conserved domains), el ORF31 resultó similar a una HNH endonucleasa (Endonucleasa homing) (E-value $5,9 \times 10^{-4}$). Por la posición en el

genoma del fago B1, esta proteína estaría vinculada a los genes que participan en la replicación del ADN fágico. Sin embargo, para el fago Lmr1 está relacionada con la etapa de empaquetamiento del ADN fágico (Durmaz y col., 2008).

El ORF35 exhibió elevada similitud con la proteína de unión del ADN del fago JL-1. Si bien en el genoma del fago JL-1 este gen participaría en el empaquetamiento del ADN, por su posición en el genoma del fago B1 participaría en la replicación del ADN (Lu y col., 2005).

Genes involucrados en la lisis del hospedador

Los ORFs 21 y 22 compartieron similitudes con las secuencias de holina y lisina de los fagos AT3 (*Lb. casei*) y JL-1 (*Lb. plantarum*), respectivamente. Por lo tanto, estos genes participarían en la lisis de la cepa hospedadora.

Otros genes con funciones putativas

Los genes que se encuentran localizados entre aquellos que codifican para proteínas de la cápside y de la cola, participan en la formación de las conexiones que permitirán la unión de ambas estructuras (cabeza y cola) así como también en el empaquetamiento del ADN (Lu y col., 2005). En dicha región del genoma del fago B1, el ORF8 exhibe homología con una proteína relacionada al empaquetamiento de ADN (del fago JL-1) y el ORF10 con la proteína de unión de la cápside con la cola (fago JL-1). Por lo tanto, estos genes participarían en el ensamblaje de las partículas fágicas.

El ORF15 fue el gen de mayor tamaño encontrado para el fago B1. Este gen codificaría para la proteína que determina el tamaño de la cola del fago ya que presentó elevada homología con el ORF1133 del fago JL-1, que codifica para dicha proteína. De manera similar, el ORF1133 evidenció el mayor tamaño entre todos los genes del fago JL-1 (Lu y col., 2005).

A través del análisis realizado al genoma del fago B1, se deduce que su material genético podría organizarse en módulos: replicación de ADN, regulación de la transcripción, empaquetamiento del ADN, morfogénesis de la cabeza, unión de la cabeza y la cola, morfogénesis de la cola y lisis celular. El módulo de replicación de ADN involucra genes que codifican para dos proteínas helicasa, una primasa y una replicasa así como también para endonucleasas y proteínas de unión al ADN. Entre estos genes, se encontraron algunos ORFs para los cuales no se evidenció homología con proteínas de la base de datos. El módulo de empaquetamiento contiene ORFs que codifican para las subunidades de la enzima terminasa y una endodeoxirribonucleasa. El módulo de morfogénesis de la cabeza incluye los ORFs que codifican para proteínas menores de la cabeza (y proteína portal), una proteína scaffold (que

contribuye con el ensamblaje de las partículas fágicas), proteínas mayores y menores de la cabeza. El módulo de unión de cabeza y cola incluye una proteína de empaquetamiento de ADN, y genes que codifican para una proteína de unión de la cola y la cabeza. Entre ellos se encuentran ORFs que evidenciaron homología con genes del fago JL-1 pero para los cuales no fue posible asignar una función específica. El módulo de morfogénesis de la cola incluye proteínas estructurales mayores y menores de la cola, así como la proteína determinante de la longitud de la cola. Finalmente, los genes de lisina y holina constituyen el módulo de lisis. Al igual que en el fago JL-1, los genes que participan en el empaquetamiento del genoma dentro de la cabeza son inmediatamente seguidos por módulos estructurales. Además, los genes de la cabeza se encuentran ubicados próximos uno del otro y preceden a los genes de la cola. Luego son seguidos por genes relacionados a la lisis celular (Lu y col., 2005).

Análisis del genoma del fago B2

En la Tabla 7 se presentan los ORFs deducidos para el genoma del fago B2 con sus respectivas funciones proteicas.

Genes involucrados en el empaquetamiento del ADN

Los ORFs 17 y 21 evidenciaron homologías con las subunidades menor y mayor de la terminasa de *Bacillus*. Estos genes se encuentran separados por una serie de ARNt y por otros genes para los cuales no fue posible asignar función proteica.

El ORF16 mostró secuencias en común con el gen pls32_p096 de *Bacillus subtilis* subsp. *natto* y fue identificada como una HNH endonucleasa (GenBank, E-value $9,89 \times 10^{-9}$). De acuerdo a la posición en el genoma, esta enzima participaría en el empaquetamiento del ADN, debido su cercanía a las terminasas.

Genes involucrados en la lisis celular

La función de lisina fue atribuida al ORF40, por homología con el fago g1e (*Lb. plantarum*). Adicionalmente, la función de lisina fue asignada al ORF57 (GenBank, E-value $2,15 \times 10^{-9}$), el cual además evidenció similitudes con el ORF121 del fago LP65 (*Lb. plantarum*). Sin embargo, no fue posible asignar la función de holina a los ORFs designados para el fago B2.

Genes involucrados en la replicación del ADN

Los ORFs 45 y 47 comparten homología con la subunidad α de la ADN polimerasa III del fago SPBc2 (*Bacillus*). De manera similar, el ORF70 evidenció similitudes con la secuencia proteica de la ADN polimerasa del fago P087 (*Lactococcus*) y el ORF73 codificaría para proteínas que participarían en la replicación.

La presencia de genes que codifican para la ADN polimerasa en el genoma fágico sugiere que el fago codifica para esta enzima en lugar de reprogramar la enzima de la cepa hospedadora. De manera similar, la presencia de esta enzima fue confirmada para el fago 949 de *Lactococcus* pero en este caso, evidenció dos subunidades y los genes que las codifican se encuentran ubicados en forma separada en el genoma fágico (Samson y Moineau, 2010).

El ORF86 codificaría para la ADN helicasa mientras que el ORF87 lo haría para una ADN primasa. Por otro lado el ORF88 evidenció homología con la exonucleasa del fago SPBc2 (*Bacillus*). Adicionalmente, los ORFs 71 y 99 codificarían para una proteína de unión de ATP/GTP. Otros genes cumplirían el rol de transportar nucleótidos (ORF69) o modificarlos (ORF65, ORF83 y ORF114). Esto sugiere que dichos genes estarían relacionados a la síntesis y replicación del ADN.

Otros genes con funciones putativas

Los ORFs 25 y 29 codificarían la producción de proteínas estructurales de la cola, por homología con fagos de enterobacterias y *Lactobacillus*.

Por otro lado, el ORF26 codificaría para una proteína que interviene en la conexión entre la cabeza y cola (GenBank, E-value 4×10^{-3}) o en el empaquetamiento de ADN (por homología con la base de datos de InterProscan). Esto sugiere que dicho gen interviene en el ensamblaje de las partículas fágicas.

Los ORFs 39 y 105 evidenciaron homologías con proteínas vinculadas a profagos. De manera similar el ORF43 codificaría para enzimas del tipo recombinasa/integrasa, las cuales también se encuentran relacionadas a la presencia de profagos.

Muchos de los ORFs del fago B2 evidenciaron homología con genes del fago LP65 (*Lb. plantarum*). Sin embargo, una elevada cantidad también presentó similitudes con diversos genes codificados por cepas de *Bacillus* y *Lactobacillus*. El genoma del fago B2, al igual que el del fago B1, podría organizarse en módulos: empaquetamiento del ADN, genes estructurales, módulo de lisis y, finalmente, los genes relacionados a la replicación del ADN. Sin embargo, esta división en módulos no fue tan clara como en el caso del fago B1.

Tabla 6. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago *Lb. plantarum* B1 y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start position	Stop position	Size (Aa) ^a	MM (kDa) ^b	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d	Predicted function ^e	Best matches (extend; %a.a identity) ^f	E-value ^g	Size (Aa) ^h	GenBank accession N ^o ⁱ
1	242	553	103	11,37	6,32	ATAAAGGAGATAACGga ATG	Terminase small subunit	ORF172 (<i>Lactobacillus</i> phage g1e) (43/96; 45%)	2x10 ⁻¹⁷	172	NP_695171
2	550	1845	431	48,86	8,16	AACATCGGGTTTCCCGa ATG	Terminase large subunit	ORF440 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (293/431; 68%)	4x10 ⁻¹⁷⁹	440	YP_223885
3	1861	3402	513	58,36	4,81	ATAACGGAGGAGTTAaaac ATG	Minor capsid protein/Portal protein	ORF506 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (284/506; 57%)	5x10 ⁻¹⁶⁰	506	YP_223886
4	3320	4132	270	30,55	8,76	CGAAAGGCGGATTGAttatca ATG	Capsid protein	ORF273 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (121/270; 45%)	1x10 ⁻⁵⁴	273	YP_223887
5	4232	4762	176	19,13	4,70	ATTGAGGAGGAGAAAccatc ATG	Scaffold protein	ORF184 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (70/161; 44%)	4x10 ⁻²	184	YP_223888
6	4780	5640	286	30,90	4,80	CGGAGGAACTTAAACa ATG	Major capsid protein	ORF286 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (198/286; 70%)	5x10 ⁻¹¹⁰	286	YP_223889
7	5688	5915	75	7,24	4,38	CAAAAGACCGCTAGCa ATG	Minor capsid protein	ORF64b (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (33/49; 68%)	5x10 ⁻⁰⁸	64	YP_223890
8	5943	6314	123	14,09	4,98	ATAATTAACGTACCCgtatgg GTG	DNA Packaging	ORF113 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (69/113; 62%)	2x10 ⁻³³	113	YP_223891
9	6311	6589	92	10,21	9,45	GGGGTTCAGGTTCTT ATG		ORF94 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (49/93; 53%)	3x10 ⁻²¹	94	YP_223892
10	6546	6959	137	15,14	9,28	GAACGTGCCGTTATCa ATG	Head to tail joining	ORF125 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (77/121; 64%)	8x10 ⁻³⁷	125	YP_223893
11	7035	7388	117	13,18	8,03	CGCTAGGGGGTGTCAcaag ATG		ORF117 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (64/117; 55%)	7x10 ⁻³²	117	YP_223894
12	7407	8033	208	22,72	4,30	AATGAGGAGTGTAaaaaaat ATG	Major tail protein	ORF199 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (131/195; 68%)	2x10 ⁻⁷³	199	ZP_03964227
13	8064	8468	134	15,15	4,95	AAAAAGGACGGTACCaacaaa ATG		ORF139 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (71/142; 50%)	8x10 ⁻²⁸	139	YP_223896
14	8546	8785	79	8,66	9,85	GAAGCCGAGGCCGTCa ATG		ORF140 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (23/79; 29%)	4,6x10 ⁻²	140	YP_223897
15	8789	12043	1084	110,91	9,57	TCGGAGGAGGTTAACga ATG	Tape measure protein	ORF1133 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (97/172; 57%)	4x10 ⁻⁵⁰	1133	YP_223898
16	12347	12877	176	19,05	8,99	ATTACCGAGCTGGCCg ATG	Minor tail protein	ORF441 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (47/101; 47%)	5x10 ⁻²¹	441	YP_223899
17	12892	15390	832	90,73	5,00	ATATAGATAGGAGTG ATG	Structural protein	ORF738 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (70/455; 60%)	0	738	YP_223900
18	15371	17479	702	75,72	5,40	CGACAGGAGGAGTTAaca ATG	Minor tail protein	ORF749 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (66/189; 35%)	1x10 ⁻²⁵	749	YP_223901
19	17491	17862	123	13,98	5,38	AGTTAGGAGGCCGAAcc ATG		(<i>Lactobacillus pentosus</i> MP-10) (54/126; 43%)	2x10 ⁻³²	127	CCB83969
20	17855	17956	33	3,75	9,21	GTATTCGAGGTGATTttg ATG					
21	18031	18363	110	12,28	6,72	AAAAAGAATTAAGGgagt ATG	Holin	ORF17 (<i>Lactobacillus</i> phage phiAT3) (40/104; 39%)	1x10 ⁻¹²	129	YP_025044
22	18363	19604	413	45,52	9,58	GATAACGAGGTACAAta ATG	Endolysin	ORF398 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (16/393; 81%)	0	398	YP_223905
23	20279	20395	38	3,91	6,71	ATAACGGCGTTAGTTat GTG					
24	20346	20810	154	17,62	5,17	CCACATGTGGCTCGCtactg GTG	Endonuclease	ORF134 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (46/129; 36%)	4x10 ⁻¹⁴	134	YP_223908
25	20813	21559	248	28,18	4,58	AGTGAGGAGGACTAAac ATG		ORF246 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (118/233; 51%)	5x10 ⁻⁵⁸	246	YP_223909
26	21950	22609	219	23,58	5,67	CGAGGAGAGATAAGCa ATG	Helicase (NTP-binding)	ORF224 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (169/218; 78%)	6x10 ⁻⁹⁶	224	YP_223910
27	22616	24556	646	72,66	5,12	AAAGGGGAAATAAGcact ATG	DNA Primase	ORF637 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (285/634; 45%)	4x10 ⁻¹⁵⁰	637	YP_223911
28	24664	24921	85	9,45	5,75	GTAAGGAGGTAATTaa ATG					
29	24921	25337	138	15,68	5,10	ATTGAGGAGGAAATGta ATG					
30	25340	25639	99	11,30	7,84	AAACGGGAGGATTATtaaat ATG					
31	25600	26091	163	18,57	10,27	ACTAAGGGGGTGAaa ATG	Endonuclease	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1 (47/165; 28%)	7x10 ⁻⁰⁵	180	YP_002117719

32	25959	26450	163	19,16	5,17	CGCGGGCACGTCATC aATT						
33	26488	26685	65	9,53	6,23	TCATAGGAGGTAATT atATG						
34	26687	27151	154	17,76	5,12	AAAAAGGGGAATTAT taacATG	Replicase	ORF153 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (74/156; 47%)	1x10 ⁻³⁶	153	YP_223913	
35	27167	27487	106	11,79	4,55	AGTAAAGGGGTAAA AcgATG	DNA binding	ORF97 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (45/94; 48%)	9x10 ⁻¹⁵	97	YP_223877	
36	27471	27677	68	8,09	9,58	GATGAGGACTTGAAC gATG						
37	27725	29155	476	53,32	9,08	TGTACGGAGGGATT GcaATG	Helicase	ORF467 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (291/446; 66%)	0	467	YP_223915	
38	29199	29471	90	10,16	4,77	ATCAAGCAAGGGAGG taATT						
39	29458	29832	124	13,8	4,38	AGAAAAGGGGTATT TtgATG						
40	29834	30253	139	15,99	5,35	TGAAAGGATTGATT AacATG						
41	30225	30659	144	16,42	5,31	AAACTAAAAGTCAC GaATG						
42	30659	31102	147	16,21	9	AAAAAGGGGTAATT GaataATG						
43	31095	32072	325	36,87	5,29	ATTATGGAGGTTGT GaaagATG	Structural protein					
44	32073	32468	131	14,30	4,46	AAATCGGAGGTTATT taaATG						
45	32601	32840	79	9,06	6,02	CGAAAGGACGAGGG AtaaATG						
46	32827	33183	118	13,68	9,25	ATCATGGAGGACGAC CaATG		(<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1) (70/109; 64%)	1x10 ⁻⁴⁶	110	YP_003062076	
47	33197	33376	59	6,50	5,30	AATAATGTTAGGCTC ggtATT						
48	33518	33706	62	7,55	5,18	AGGAAAGTGGTAAT AaaaATG						
49	33703	33831	42	4,74	8,5	GGATATGAGGTGATC gaATG						
50	33857	34030	57	6,21	12,05	AACAAAGGGGTCTT AtattATG						
51	34030	34275	81	9,3	5,58	AAAAAGGGGGCCAA GtaATG		ORF77 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (22/75; 30%)	1x10 ⁻³	77	YP_223874	
52	34341	34634	97	11,51	9,45	AGAACGTCATGGGTC GATG						
53	34621	34920	99	11,13	9,77	TAAAAGGGCGGAG AttATG						
54	34917	35108	63	7,19	4,44	ATAAAGGGGATAAA AgtATG						
55	35077	35238	53	6,12	6,04	CGAAAAGGGGTTTT TaaATG						
56	35251	35685	144	16,77	5	AATTAGGAGGGTTTT TaccATG						
57	35678	36124	148	17,10	6,07	ACGGAGGTTGAAATC aATG						
58	36117	36512	131	14,93	9,81	ATCGAGGTGAAGCTA cATG						
59	36514	37032	172	19,13	10,03	TACTGGGAGGTGTT AtgacATG	Endodeoxyribonuclease	ORF51 (<i>Lactobacillus</i> phage phiAT3) (56/163; 35%)	1x10 ⁻¹⁰	222	YP_025078	
60	37025	37441	138	15,66	9,07	TGAAAGGTGATAATA ATG						

a: Número de aminoácidos de la proteína.

b: Tamaño de la proteína (kDa).

c: Punto isoeléctrico de la proteína (pI).

d: RBS: Ribosome Binding Site; Nucleótidos en negrita son idénticos a la secuencia del RBS.

Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio.

Codon de inicio (Start codon): Nucleótidos en letra mayúscula, negrita y azul.

e: Función putativa.

f: Proteína que evidenció mayor homología con la secuencia dada.

g: Se consideraron aquellas proteínas cuyo E-value fue inferior a 0,047.

h, i: Número de aminoácidos (h) y Número de acceso (en GenBank) (i) de la proteína que evidenció mayor homología.

Tabla 7. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago *Lb. plantarum* B2 y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start position	Stop position	Size (Aa) ^a	MM (kDa) ^b	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d	Predicted function ^e	Best matches (extend; %a.a identity) ^f	E-Value ^g	Size (Aa) ^h	GenBank accession N ^{oi}
1	295	179	38	4.41	9.3	ATTGGAAAAGTGATGacATG					
2	590	300	96	10.98	5.17	ATATAGGAGAGTGT AataATG					
3	707	609	32	3.64	4.81	AGCTTGGGCTTTATtgATG					
4	1178	825	117	13.73	4.77	AAAAAGTGAGGAAT AagatATG					
5	1429	1196	77	8.64	4.37	ACGTTTtagGTGAACataATG					
6	1663	1439	74	8.33	4.76	CATTAGGAGGAAAATATG					
7	1921	1673	82	9.36	7.81	GTGTGGAGATGATAttaaATG					
8	2142	1918	74	8.20	3.79	AAATAGGAGGATATataATG					
9	2352	2158	64	7.21	4.45	AATTAGGAGGAAATAtaaaaATG					
10	2538	2371	55	6.09	9.30	AATAAAGAGGTGAC AataATG					
11	2707	2552	51	5.97	8.10	GAAAACGAGGTGATAataATG					
12	3401	2769	210	25.11	5.21	TAAAAGGAGGAATAAaattATG	Fatty acid/phospholipid synthesis protein	Fatty acid/phospholipid synthesis protein PlsX (<i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528) (29/154; 19%)	9x10 ⁻²	337	YP_003779451
13	3715	3542	57	6.54	10.30	ATTCATGTTGTGTTAactATG					
14	3824	4033	69	7.76	4.78	ATAAAGGAGGAATATataATG					
15	4262	4393	43	4.80	3.93	AAAAGGGAGGACTTAgcATG	C.D.: transcription factor	EUBREC_3432 (<i>Eubacterium rectale</i> ATCC 33656) (15/43; 35%)	2x10 ⁻³	209	YP_002939292
16	4320	4802	160	18.56	9.25	ACAAGAAAGATGATTATG	C.D.: HNH endonuclease (9.81x10 ⁻⁹)	pls32_p096 (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i>) (54/122; 44%)	8x10 ⁻²⁶	135	YP_004243694
17	4815	5321	168	18.71	5.08	TCTAAGGGGTGAACacATG	Terminase small subunit	(<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Natto</i>) (61/166; 37%)	3x10 ⁻²²	163	YP_004243693
18	5476	5988	170	19.71	4.94	AAAAGGTAGGTAAAGtcaaATG		gp089 (<i>Lactococcus</i> phage 949) (33/114; 29%)	8x10 ⁻¹¹	171	YP_004306249
ARNt	6246	6317					tRNA-Asn				
19	6513	6283	76	8.81	5.85	ATCTAGTACTGAATCcgceATG					
ARNt	6925	6997					tRNA-Leu				
ARNt	6999	7072					tRNA-Met				
20	7143	7403	86	10.23	5.25	GAAAGAGAGGAAAACtATG		ORF 78 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (81/86; 95%)	1x10 ⁻⁴⁰	109	YP_164713
ARNt	7742	7814					tRNA-Gly				
21	7937	9646	569	65.00	5.46	TATAACGAGGTGATAtgTTG	Terminase large subunit	(<i>Bacillus cereus</i> AH1273) (247/550; 45%) (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. NCIB 3610) (164/422; 39%)	8x10 ⁻¹⁶⁸	562	ZP_04177803
22	9830	11137	435	47.95	4.79	ACAGAAGATACGGTTATG	Portal protein		3x10 ⁻⁸²	459	ZP_03598334

Resultados

23	11133	12236	367	40,58	4,34	TGTTAGGAGGTAATGacaATT	Major capsid protein/protease	(<i>Bacillus subtilis</i> subsp. natto) (93/201; 46%)	5x10 ⁻³⁴	313	YP_004243688
24	12240	13526	428	45,85	5,29	GATTTGGAGGCTAAttaATG	Major capsid protein	(<i>Bacillus subtilis</i> subsp. natto) (158/420; 38%)	2x10 ⁻⁵⁸	382	YP_004243687
25	13657	14115	152	15,85	4,52	TGATAGGAGGGAATAActaTTG	Tail protein	(<i>Enterobacteria</i> phage SPC35) (37/90; 41%)	5x10 ⁻⁰⁹	162	YP_004306621
26	14153	14440	95	10,67	4,50	ACATAGGAGGTGTGAtagATG	C.D.: DNA packaging				
C.D.: Head-Tail Connector (4,0x10 ⁻³)											
27	14453	14881	142	15,94	5,35	TTAGTGAGGTGAGAAaATG	Head-tail adaptor	(<i>Lactobacillus buchneri</i> NRRL B-30929) (23/87; 26%)	1,5x10 ⁻²	120	YP_004398834
28	14832	15323	163	18,44	6,23	AAACGGCGGTTTCATCtgGTG	Head-tail joining protein	(<i>Lactobacillus</i> phage Sal2) (31/126; 25%)	7,6x10 ⁻²	130	YP_535185
29	15447	15704	85	9,68	4,78	GTTGAGAATAAAATACTG	Tail protein	(<i>Lactobacillus</i> phage phiAT3) (23/83; 28%)	5x10 ⁻²	123	YP_025035
30	15723	16334	203	21,50	4,74	AAGAAAGAGGTAATActaATG	Major tail protein	(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7) (57/164; 35%)	1x10 ⁻²¹	191	YP_003919449
31	16442	16861	139	15,60	4,40	AAAAATAAAATATTTAgATG		LAR_1055 (<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112) (31/95; 33%)	1x10 ⁻⁰⁵	132	YP_001842051
32	16740	17039	99	11,34	4,37	AGAATCAAGCAAGACcgATG					
33	17115	22778	1887	199,48	10,07	TGCAAGGAGGGTTTaaATG	Tail tape measure protein	(<i>Lactobacillus reuteri</i> CF48-3A) (214/492; 44%)	9x10 ¹⁰³	1500	ZP_03973555
34	22802	24613	603	66,08	6,04	ATACGAGGGTAATCcctcGTG	Structural protein	(<i>Lactobacillus</i> phage Sha1) (321/596; 54%)	1x10 ⁻¹⁷⁷	590	ADW01308
35	24669	27053	794	88,01	4,65	GATTAGGAGGTAATGgaATG	Structural protein	(<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ST-III) (358/807; 45%)	0	804	YP_003924980
36	27065	30406	1113	118,75	4,85	GAGTAGGAGGTTATCaaATG	Tail fiber	(<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ST-III) (418/580; 73%)	0	848	YP_003924979
37	30403	30624	73	8,03	4,66	CTGGAGGATAAAATCaaATG		(<i>Lactobacillus</i> phage Sha1) (61/71; 86%)	3x10 ⁻³⁴	84	ADW01311
38	30639	31061	140	16,14	4,67	AAATAGGAGGAAATTaactATG		ORF 96 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (46/123; 37%)	5x10 ⁻²⁰	125	YP_164731
39	31078	32277	399	41,82	4,63	AGAAAGGAATGATTTggtTTG	Prophage Lp2	(<i>Lactobacillus</i> phage Sha1) (115/179; 64%)	3x10 ⁻⁶⁵	294	ADW01313
40	32351	33742	463	50,72	9,39	TAAAGGAGACAAAagATG	Lysin	(<i>Lactobacillus</i> phage phig1e) (192/466; 42%)	1x10 ⁻⁸⁰	442	YP_003084340
41	33760	34098	112	12,86	5,30	ATAAGGAGGTTTCCaacATG		phig1ep16 (<i>Lactobacillus</i> phage phig1e) (26/92; 28%)	4x10 ⁻⁰⁵	118	YP_003084354
42	34085	34693	202	21,08	4,35	AGGGGAGAAATAAACATG		LPST_C1664 (<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ST-III) (53/95; 56%)	3x10 ⁻³⁰	176	YP_003924974
43	34751	35725	324	38,26	7,71	GGGAATGGTGAGATAcaATG	Recombinase/integrase	(<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> str. T03a001) (121/321; 38%)	2x10 ⁻⁷⁰	322	ZP_04118237
44	35741	35989	82	9,58	8,97	AATAAGGAGTGTTTTaaattATG					
45	38528	36027	833	95,05	7,90	ATTAGTCAGATGAAGGatATA	DNA polymerase III alpha subunit	(<i>Bacillus</i> phage SPBc2) (279/833; 34%)	7x10 ⁻¹²⁸	1305	NP_046685
46	39400	38645	251	30,05	9,77	TGACAGGAAATGGTCgATT					
47	40897	39467	476	54,87	5,68	ATAGAGGAGGAAAAataATG	DNA polymerase III alpha subunit	(<i>Bacillus</i> phage SPBc2) (171/472; 37%)	3x10 ⁻⁷²	1305	NP_046685
48	41354	41025	109	12,49	4,43	AGCTAGGAGGACTATaATG					
49	41671	41354	105	11,72	8	CCAAAGAAAACAGCaATG					

Resultados

50	41984	41658	108	12,54	7,92	AGAAAGGAAAACATAATG							
51	41914	42117	67	7,86	5,45	AGTACGATGTTCAAGaATG							
ARNt	42308	42237											RNAt-Arg
ARNt	42595	42522											RNAt-Arg
52	42959	42699	86	9,86	4,55	AGAGGAGAAGTAAAaaaATG							
53	43264	42965	99	11,73	7,76	TTATTGGAGGACATAttATG				ORF148 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (39/95; 42%)	2×10^{-16}	93	YP_164783
54	43897	43340	185	21,36	9,15	ATTAAGAACATTACCATG				ORF145 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (76/121; 63%)	6×10^{-46}	157	YP_164780
55	44582	44277	101	11,69	4,98	TGATTGGAGCAGTGAataATG				ORF21 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (32/86; 38%)	2×10^{-10}	95	YP_164656
56	44845	44582	87	10,13	5,06	ATAGGCTAGTTAATGctATG							
57	45726	45028	232	24,30	5,18	AGAAAGAGGTTTATttaaATG		C.D.: Lysin ($2,15 \times 10^{-9}$)		ORF121 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (92/204; 46%)	1×10^{-33}	193	YP_164756
58	46337	45804	177	20,74	8,76	AGGAGAAAATTAAATcATG				(<i>Gemella haemolysans</i> ATCC 10379) (28/127; 22%)	3×10^{-4}	176	ZP_04776677
59	46680	46330	116	13,86	6,12	TGCCTGGAGGTTGCAttATG							
60	46931	46671	86	9,65	5,83	AGCGAGGAAAACGGCcgGTG		Growth inhibitor		(<i>Anaerococcus lactolyticus</i> ATCC 51172) (36/92; 39%)	2×10^{-14}	116	ZP_03915327
61	47023	46868	51	6,26	9,51	ATAAATATGTTGGTAaATG							
62	47458	47126	110	12,81	6,29	TGAGATTTTGAATAcATG							
63	47855	47460	131	15,94	7,80	GAAAGAGAGGTAAATaatgATG				ORF32 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (81/124; 66%)	1×10^{-52}	130	YP_164667
64	48306	47977	109	12,46	4,19	TGAAGGGAGGTTAttcATG							
65	48770	48306	154	17,13	4,40	AAGACGGAGGTAAAAtaATG		Nucleoside deoxyribosyltransferase		(<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1) (68/152; 45%)	7×10^{-33}	154	YP_810473
66	49087	48770	105	11,98	7,74	AGATGGAGAGTGCTAaagATG		Glutaredoxin		(<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFSI) (31/86; 37%)	1×10^{-07}	76	NP_784455
67	49217	49065	50	6,05	4,16	ATATGGAATACGGTAgcATG							
68	49575	49234	113	13,18	4,07	GGAAAAGTGATTGTAATG				ORF127 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (41/64; 65%)	3×10^{-16}	74	YP_164762
69	50369	49665	234	26,5	9,43	CAGAGTCAGTTAGTCggGTG		Nicotinamide mononucleotide transporter		(<i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4) (149/216; 69%)	4×10^{-104}	248	ZP_06196053
70	51724	50492	410	46,20	5,67	TACTAGAGGGAGAACttaATG		DNA polymerase		(<i>Lactococcus</i> phage P087) (107/338; 32%)	2×10^{-24}	414	YP_002875721
71	52780	51737	347	39,17	5,89	AGGAGTGAGAGTATAaaaATG		ATP/GTP binding protein		(<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. NCIB 3610) (134/352; 39%)	6×10^{-58}	344	ZP_03598279
72	53149	52808	113	12,91	4,22	TAATAGGAGATTATAaaaATG							
73	54148	53165	327	36,01	4,80	AACTAGGAGGAATTTgtaATG		C.D.Replication protein ($2,21 \times 10^{-3}$)		Bacteriophage related protein (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i>) (99/336; 30%)	8×10^{-29}	322	BAJ77024
74	54555	54220	111	13,06	4,42	CACGATAATGTGAATtATG				BsubN3_22549 (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. NCIB 3610) (27/92; 30%)	$7,3 \times 10^{-2}$	344	ZP_03598300
75	55051	54527	174	20,35	9,20	TAAAATTAATAATACaaATG				LRU_02117 (<i>Lactobacillus ruminis</i> SPM0211) (68/143; 48%)	1×10^{-38}	151	ZP_08564332

Resultados

76	55516	55325	63	7,16	4,74	ATAAATATAAGGAAGtATG								
77	55706	55509	65	7,41	7,96	ATTAGTGAGGGAAAAtaATG								
78	56125	55706	139	16,22	8,44	AATAAGGAGGATATAaataATG								
79	57158	57439	93	10,76	5,07	ATAAAGAATATTTCAagATG								
80	57420	57722	100	12,09	8,76	TTAATTGGGGTAATGtaaaatATG								
81	57701	57985	94	10,74	4,45	AGAAAGGTGATATTGagaATG								
82	57966	58499	177	20,50	6,31	GAAGTGAGTGTGAGCgaatATG		Sea_0483 (<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> TM300) (32/67; 48%)	1×10^{-09}	158	YP_002633582			
83	58517	59224	235	27,24	4,84	AATTAGGAGGAAAAAtaTTG	Deoxyguanosine kinase	(<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334) (88/230; 39%)	7×10^{-43}	242	YP_806433			
84	59221	59421	66	7,09	7,92	AGAAGCGAGGAATTTagaATG								
85	59491	59961	156	18,17	9,12	AAACAGGAGGTAAAaccaATG		(<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i>) (49/162; 31%)	3×10^{-12}	162	BAJ77035			
86	59954	61543	529	60,29	4,94	TTAGTGGAGATGATTtacTTG	DNA helicase	(<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i>) (186/517; 36%)	2×10^{-89}	530	BAJ77036			
87	61745	62590	281	32,05	8,59	CTCAAACGTGGTTCaATG	DNA primase	(<i>Lactococcus</i> phage 949) (49/162; 31%)	2×10^{-06}	330	ADM73619			
88	62587	64332	581	65,56	5,25	ACAAGGAAGGTAATGtcTTG	Single-stranded-DNA-specific exonuclease	(<i>Bacillus</i> phage SPBc2) (127/427; 30%)	6×10^{-29}	576	NP_046684			
89	64406	64726	106	12,40	6,11	AAATAGGAGGTATGAttgATG								
90	64717	64896	59	6,91	8,77	ACAGCATGGTTAACaattgaATG								
91	64909	65292	127	14,37	6,56	CATTAGGAGGAAAAAagcATG		ORF14 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (53/118; 45%)	2×10^{-22}	120	YP_164649			
92	65255	65623	122	13,64	8,79	AACATGGATATAATAttaATG								
93	65616	65816	66	7,65	9,07	TCGCAGGAGTCATTcagtaaaATG								
94	65822	66268	148	17,83	6,73	AGAGGGGTGATTAACATG								
95	66283	66765	160	18,20	6,31	AAATTGGAGGTATAAtATG								
96	66875	67180	101	11,67	8,50	AGTAAGGAGCGAATAaaaATG								
97	67198	67479	93	11,03	4,43	AAAAAGGAGAAGATAatcaATG								
98	67529	67873	114	13,47	4,8	TAAATGACGAAAGAactaATG		ORF13 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (33/106; 31%)	7×10^{-09}	124	YP_164648			
99	67870	68175	101	11,72	5,26	TGGAATGGAGAGAGCATA	DNA binding protein	ORF97 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (66/97; 69%)	3×10^{-32}	97	YP_223877			
100	68172	68573	133	15,56	4,43	AAAGAGGAGGATAAGaagctATG		ORF5 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (26/71; 37%)	0,1	182	YP_164640			
101	68896	69588	230	26,35	6,67	GGAGAAGAGGAGTTTaaatATG		ORF34 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (90/244; 37%)	1×10^{-37}	229	YP_164669			
102	69578	70021	147	16,90	5,90	AGAAAGGTGACAACGATG		ORF142 (<i>Lactobacillus</i> phage phiJL-1) (52/149; 35%)	1×10^{-08}	142	YP_223880			
103	70100	70513	137	15,67	3,91	AGAAAGAAGGACAGTaccATG								
104	70480	70689	69	7,74	4,71	AACTGGTACAACATCtagaATG								

Resultados

105	70682	71113	143	16,31	4,43	AAAACGGAGGTGGCAacg ATG	Prophage Ipl1 protein 30	(<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1) (54/150; 36%)	1x10 ⁻¹²	115	NP_784418
106	71110	71301	63	7,56	5,25	TTATTGGAGGGCGGACaa ATG					
107	71546	71743	65	7,59	4,55	GAAAAGGAGATTTAAat ATG					
108	71911	72354	147	16,62	4,93	TCGATGGTAGTGACGat ATG		ORF9 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (60/142; 43%)	2x10 ⁻²³	144	YP_164644
109	72347	72523	58	6,86	5,33	GTAGAGGAAGACCAGgcca ATG					
110	72510	72953	147	17,40	5,65	AGGAAGCAGTGGTAatc ATG		ORF93 (<i>Lactobacillus</i> phage phiL-1) (54/91; 59%)	4x10 ⁻²²	93	YP_223879
111	72964	73206	80	9,45	4,69	TGTTAGGGGGAATAat ATG		ORF73 (<i>Lactobacillus</i> phage phig1e) (16/50; 32%)	2x10 ⁻³	73	NP_695175
112	73215	73394	59	7,16	9,79	GGAATAGAGGTGTTAA ATG					
113	73561	73971	136	15,79	5,55	TAAAGGAAGGTGACa ATG					
114	73964	74617	217	24,98	4,98	AGTAAGAAGGAAAAa ATG	Thymidine kinase	(<i>Enterobacteria</i> phage RB69) (56/196; 29%)	1x10 ⁻¹²	193	NP_861801
115	74614	74793	59	6,85	9,30	AGAAAGCGGGTTAAttgaaga ATG					
116	74839	74732	35	4,01	9,99	TTGAAGAACTTTATCtatt ATG					
117	75647	75480	55	6,47	8,24	TTAAAGCCTATATACgt ATG					
118	76038	76283	81	9,18	6,25	AGGAAGGTGTAAAGagtc ATG					
119	76295	76459	54	6,46	6,15	TTATAGGGGTATAAcg ATG					
120	76474	76608	44	5,04	7,88	GTAACGGAGGGAAAa ATG					
121	77015	77182	55	6,46	3,90	AGAAAAGGGTTTCaaa ATG					
122	77272	77520	82	9,22	3,47	GAAAAGGAAGTTATCatt ATG					
123	77549	77731	60	7,00	9,30	TAAAAGGGGTGTTGag ATG		ORF40 (<i>Staphylococcus</i> phage 2638A) (33/56; 59%)	9x10 ⁻¹²	93	YP_239845
124	77757	78140	127	14,47	10,59	AGAATAGAGGCTTATaaa ATG		ORF165 (<i>Lactobacillus</i> phage LP65) (85/122; 70%)	5x10 ⁻⁵⁸	135	YP_164800
125	78452	78724	90	10,47	3,80	TGAAAGGGGCTGACAtatt ATG					
126	78736	79155	139	15,65	10,10	AATTAGGGGTGTATAaa ATG					
127	79214	79630	138	15,81	4,29	AAATAAGGGTTGCAAttaa GTC		gp24 (<i>Brochothrix</i> phage A9) (37/125 ; 30%)	2x10 ⁻²	198	YP_004301357

a: Número de aminoácidos de la proteína.

b: Tamaño de la proteína (kDa).

c: Punto isoeléctrico de la proteína (pI).

d: RBS: Ribosome Binding Site; Nucleótidos en negrita son idénticos a la secuencia del RBS.

Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio.

Codon de inicio (Start codon): Nucleótidos en letra mayúscula, negrita y azul.

e: Función putativa.

f: Proteína que evidenció mayor homología con la secuencia dada.

g: Se consideraron aquellas proteínas cuyo E-value fue inferior a 0,1.

h, i: Número de aminoácidos (h) y Número de acceso (en GenBank) (i) de la proteína que evidenció mayor homología.

C.D.: Conserved Domains.

1.1.3. Identificación de proteínas estructurales

Para el fago B1 se evidenciaron 5 bandas en el gel SDS-PAGE (Figura 22). La banda A, de peso molecular estimado en 80 kDa, fue asociada a los ORFs 18 y 27 cuyos pesos moleculares fueron 75,7 y 72,6 kDa, respectivamente. El ORF18 corresponde a una proteína menor de la cola ya que evidenció homología con el ORF749 del fago JL-1. Lu y col. (2005) reportaron que esta proteína del fago JL-1, además de cumplir funciones como proteína de la cola, participaría en la especificidad del hospedador ya que evidenció homología con anti-receptores de diversos fagos de bacterias lácticas, determinando de esta manera el rango de hospedadores. Por otro lado, para el ORF27 fue asignada la función de primasa, como se mencionó anteriormente.

En la banda B, se identificó el ORF3, cuyo peso molecular (58,3 kDa) fue semejante al estimado (60 kDa) y cuya función corresponde a una proteína menor de la cápside (por homología con el fago JL-1). Adicionalmente, a este ORF se le asignó la función de proteína portal debido a la homología evidenciada con genes de fagos de la familia Sfi11 y por su ubicación a continuación de los genes que codifican para las subunidades de la terminasa. Además, el tamaño (58,4 kDa) y el punto isoeléctrico (4,8) de la proteína derivada del ORF3 son similares a los de proteínas portales de fagos relacionados (entre ellos JL-1 y gle). Las proteínas portales conforman el punto de inicio durante el empaquetamiento de ADN y además determinan la cantidad de ADN que será empaquetado (Lu y col., 2005).

En la banda C (40 kDa) se identificaron dos ORFs, 22 y 43, cuyos pesos moleculares fueron, 45,5 y 36,8 kDa, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, el ORF22 exhibió homología con endolisinas. Sin embargo, para el ORF43 no fue posible atribuir una función putativa mediante análisis bioinformático y por ello fue designada como proteína estructural.

Por otro lado, los ORFs 4 (31 kDa) y 6 (30 kDa), que evidenciaron homología con proteínas de la cápside del fago JL-1, fueron identificados en la banda D (30 kDa).

Finalmente, en la banda E (25 kDa), se identificaron dos ORFs (12 y 16), cuyos pesos moleculares fueron, respectivamente, 22,7 y 19, y cuya función correspondió a proteínas de la cola (por homología con el fago JL-1).

Cuando se realizó el análisis proteómico de la partícula fágica completa, se evidenciaron 4 proteínas adicionales (ORF7, ORF15, ORF17 y ORF21). Los ORFs 7, 17 y 21 correspondieron a la proteína menor de la cápside, proteína determinante del tamaño de la cola y holina, respectivamente. Debido a que hasta el momento no se ha encontrado homología en la base de datos para el ORF17, la proteína derivada de este gen fue designada

como estructural. Por lo tanto, para el fago B1 fueron identificadas 13 proteínas estructurales en total.

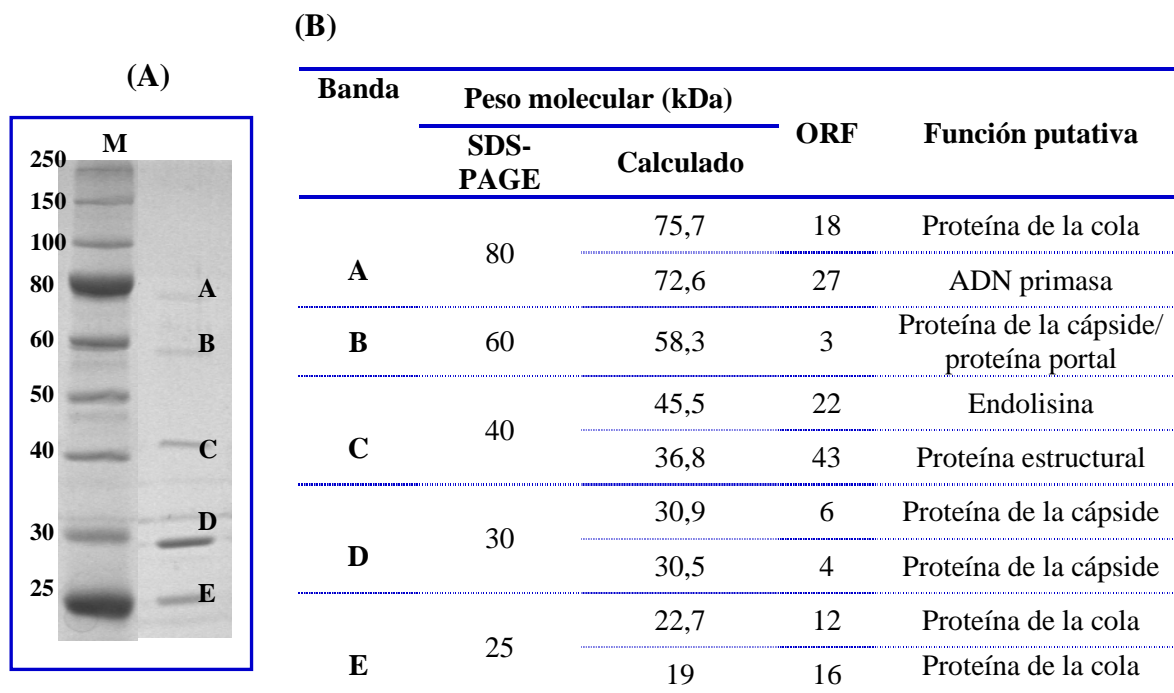


Figura 22. Análisis de proteínas estructurales del fago B1. **A)** Migración de las proteínas del fago B1 en un gel SDS-PAGE 12% seguido por la tinción con el colorante azul de Coomassie. **B)** Identificación y caracterización de las proteínas estructurales del fago B1 analizadas por LC-MS/MS.

Con respecto al fago B2, se observaron 11 bandas en el gel SDS-PAGE (Figura 23). Las bandas A (ORF33), C (ORF35), J (ORF30) y K (ORF28) fueron asociadas con proteínas que evidenciaron un peso molecular similar al estimado en el gel. La función de la proteína determinante del tamaño de la cola fue asignada al ORF33 (por homología con *Lb. reuteri*) mientras que al ORF30 fue asociada una proteína de la cola. Por homología con el fago Sal2 (*Lactobacillus*), la función de proteína de unión entre cabeza y cola fue asignada al ORF28 (identificado en la banda K). Adicionalmente, el ORF30 (21,5 kDa) también fue asociado a la banda I, aunque ésta presentó un peso molecular superior (28 kDa).

Debido a que los ORFs asociados a las bandas C y D (ORF35 y ORF34, respectivamente) no evidenciaron homología con las secuencias presentes en la base de datos, fueron designados como proteínas estructurales. Por otro lado, en la banda B (130 kDa) fue identificado el ORF36 (118,6 kDa), el cual estaría asociado a fibras de la cola, mientras que el ORF22 (47,9 kDa), que presentó homología con una proteína portal, fue asociado a la banda E (55 kDa).

El ORF24 (45,8 kDa), que codificaría para proteínas mayores de la cápside, fue identificado en la banda F, cuyo peso molecular fue estimado en 45 kDa. Sin embargo, este

ORF también fue asociado a bandas de menor peso molecular (G y H). Posiblemente esta proteína sufrió un procesamiento postraduccional debido que al analizar la secuencia del ORF24 en ambas bandas, se observó la ausencia del extremo N-terminal. De esta manera, el peso molecular de la proteína truncada es de 32 kDa y es por ello que aparece asociada a las bandas G y H, de 35 y 30 kDa, respectivamente. Este fenómeno es común entre proteínas mayores de la cápside, las cuales a menudo resultan clivadas por una proteasa (Garneau y col., 2008). Por otro lado, el ORF23 (40,8 kDa), que fue asociado a la banda G, mostró homología con la proteína mayor de la cápside de *Bacillus* y con una peptidasa U35 (GenBank, E-value $3,8 \times 10^{-30}$). Esta peptidasa podría ser la responsable del clivaje del ORF24. De manera similar, Garneau y col. (2008) sugieren que la peptidasa asociada a una proteína de la cápside participaría en el clivaje evidenciado para una proteína de la cola del fago 1706 (*Lactococcus*). Adicionalmente, se encontraron dos bandas de peso molecular estimado en 170 y 150 kDa que correspondieron a proteínas no específicas. En total, para el fago B2 fueron identificadas 9 proteínas estructurales.

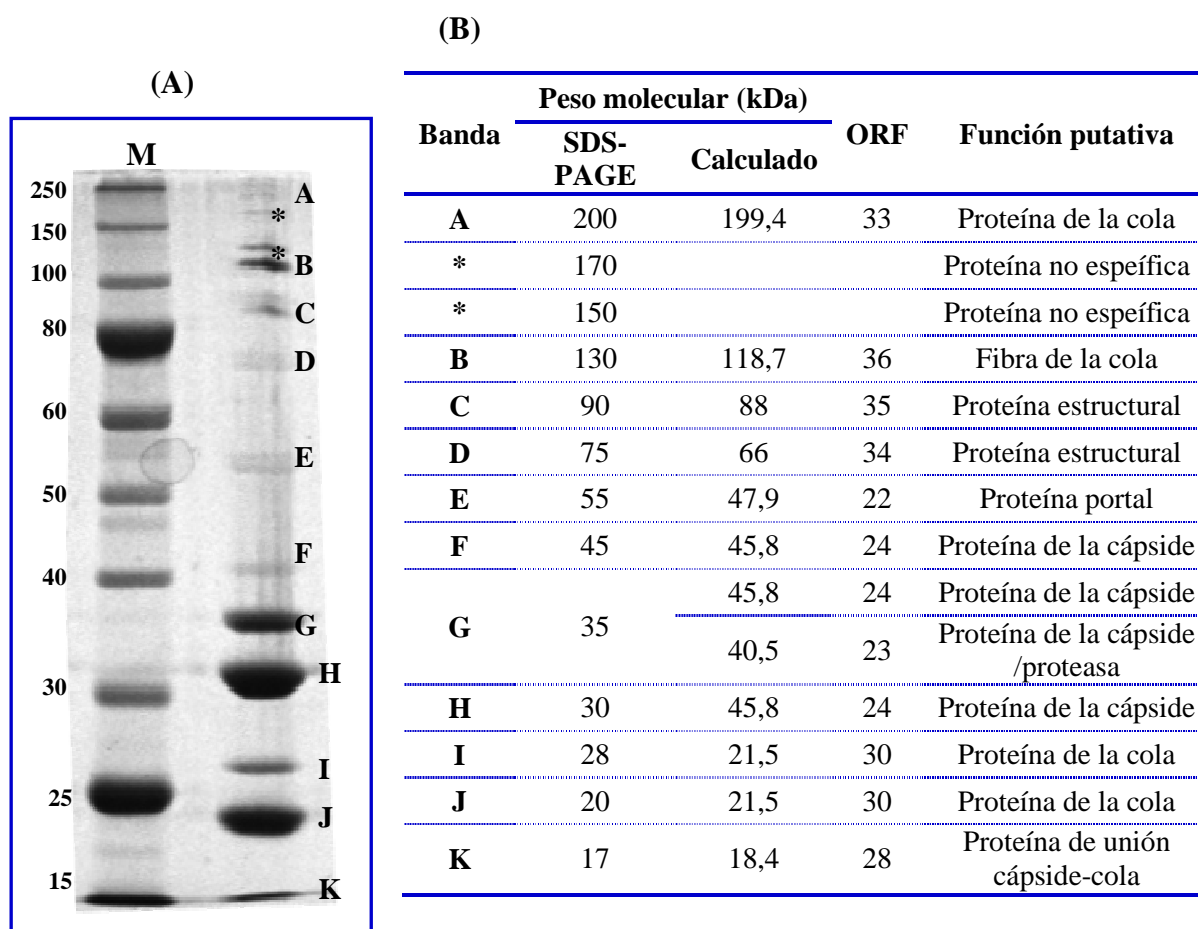


Figura 23. Análisis de proteínas estructurales del fago B2. A) Migración de las proteínas del fago B2 en un gel SDS-PAGE 12% seguido por la tinción con el colorante azul de Coomassie. B) Identificación y caracterización de las proteínas estructurales del fago B2 analizadas por LC-MS/MS.

1.2. Microscopía electrónica

Ambos fagos presentaron cápsides icosaédricas y colas estriadas y no contráctiles (Figura 24). Las dimensiones de las cápsides y de las colas de los fagos se detallan en la Tabla 8. Ambos fagos pertenecen a la familia *Siphoviridae*, según la clasificación de Ackermann (2009). En particular, para el fago B1 se observó la presencia de fibras en la base de la cola.

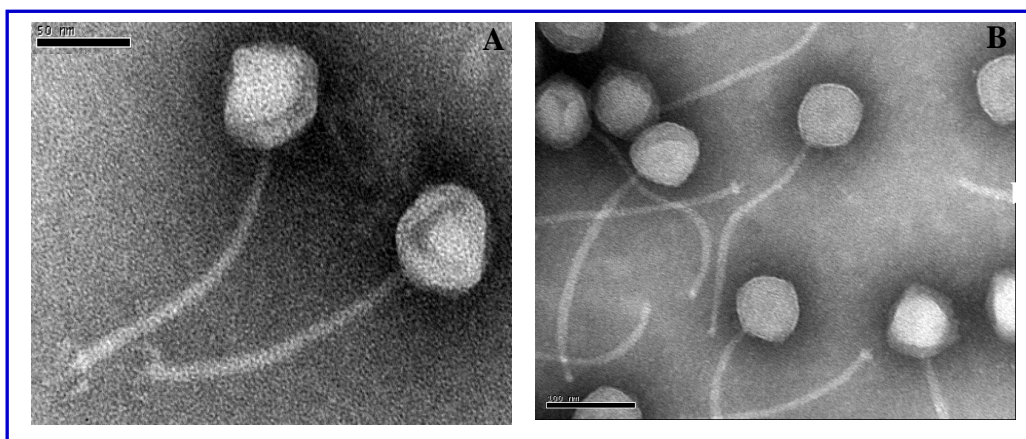


Figura 24. Micrográficas electrónicas de los fagos B1 (A) y B2 (B) de *Lb. plantarum*. Las barras corresponden a 50 (A) y 100 nm (B).

Tabla 8. Dimensiones de los fagos B1 y B2. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Fago	Cápside (nm)	Cola	
		Longitud (nm)	Diámetro (nm)
B1	54 \pm 3	157 \pm 10	8 \pm 1
B2	74 \pm 2	240 \pm 3	10 \pm 1

1.3. Viabilidad durante la conservación

De los cuatro fagos estudiados (B1, B2, FAGK1 y FAGK2), el fago B1 evidenció mayores reducciones en la viabilidad a temperaturas de congelamiento mientras que para el fago B2 los recuentos de partículas fágicas permanecieron prácticamente inalterados en las mismas condiciones. A 4°C se observaron importantes pérdidas de viabilidad para los 4 fagos estudiados.

Específicamente, a 4°C, el fago B1 presentó pérdidas de viabilidad del 50% luego del primer mes de almacenamiento. Luego, la caída en los recuentos ocurrió de manera más paulatina hasta el séptimo mes, permaneciendo viables el 40% de las partículas fágicas iniciales. A los 9 meses, menos del 8% de partículas fágicas fueron capaces de infectar a su cepa sensible. Cuando el fago fue conservado por congelamiento, los recuentos cayeron un 20% luego de los 6 meses y luego del séptimo mes un 40% (-80°C) y 55% (-20°C). A partir de aquí la viabilidad a -80°C permaneció prácticamente inalterada hasta los 42 meses mientras que a -20°C se observó una mayor caída en los recuentos fágicos (reducciones del 60% con respecto a los valores iniciales) (Figura 25A).

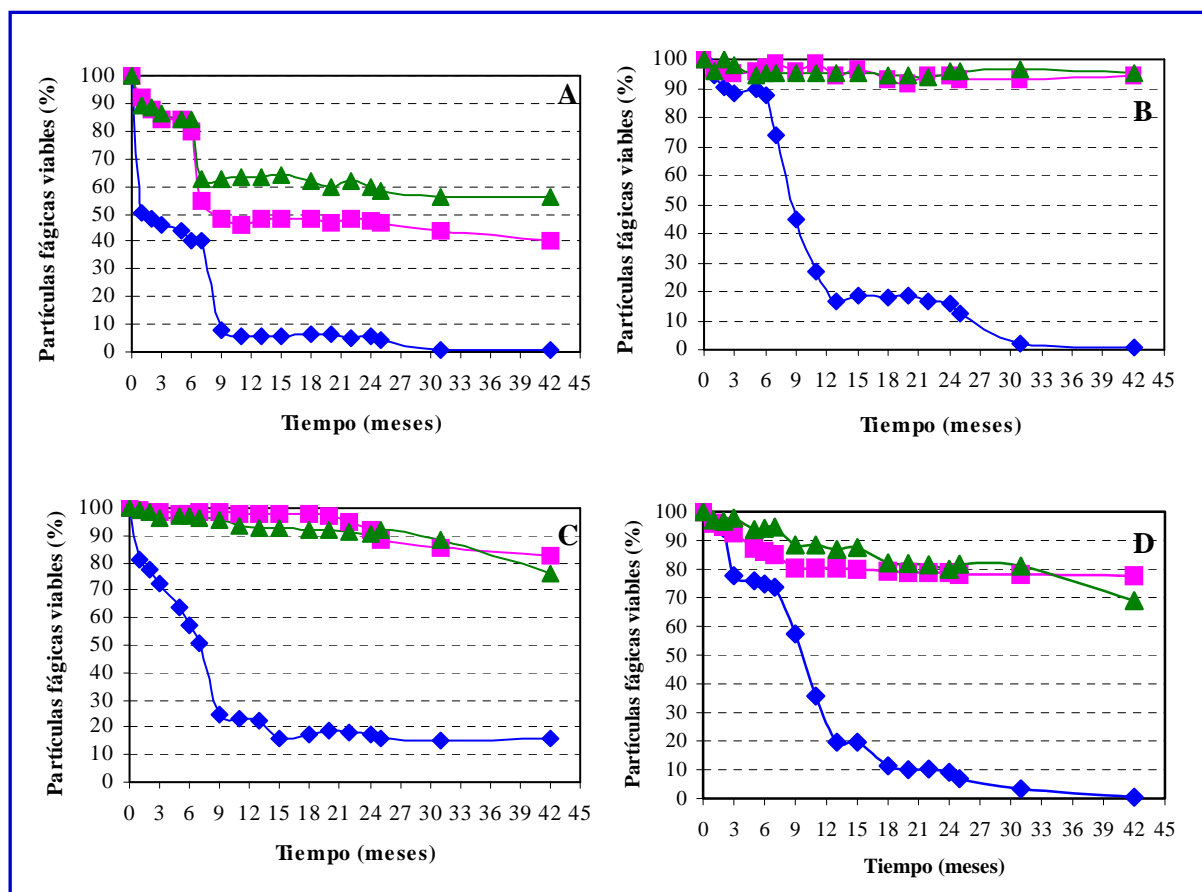


Figura 25. Viabilidad de los fagos B1 (A), B2 (B), FAGK1 (C) y FAGK2 (D) durante el almacenamiento a 4°C (♦) en caldo MRS, -20°C (■) y -80°C (▲) en caldo MRS adicionado de glicerol 15% v/v.

La viabilidad del fago B2 permaneció prácticamente inalterada durante los 42 meses de almacenamiento a -80°C y -20°C . Sin embargo a 4°C se observó una pérdida de viabilidad del 10% a los 6 meses y luego un importante descenso en el número de partículas fágicas infectivas hasta los 13 meses. A los 31 meses de almacenamiento, los porcentajes de viabilidad cayeron por debajo del 1% (Figura 25B).

Los recuentos de las partículas fágicas del fago FAGK1 permanecieron prácticamente sin variación durante los primeros 22 meses del ensayo a -20°C y -80°C . Luego se observaron pequeñas reducciones en la viabilidad de dicho fago alcanzando valores de aproximadamente el 80% a ambas temperaturas al finalizar los experimentos (Figura 25C). Con respecto a 4°C , se observó una importante pérdida de infectividad durante los primeros 9 meses de estudio (80%) pero luego el número de partículas fágicas infectivas (18%) se mantuvo prácticamente estable hasta culminar el ensayo (42 meses).

La viabilidad a -20°C y -80°C del fago FAKG2 disminuyó de manera paulatina durante los 42 meses de estudio, alcanzando porcentajes del 80% (-20°C) y 70% (-80°C). A los 13 meses, sólo el 20% de las partículas fágicas mantuvieron su capacidad infectiva a 4°C ; luego, la viabilidad disminuyó de manera no tan pronunciada hasta los 25 meses, alcanzando después de este período valores inferiores al 10% (Figura 25D).

1.4. Viabilidad a distintos valores de pH

Los cuatro fagos estudiados (B1, B2, FAGK1 y FAGK2) mostraron alta viabilidad dentro un amplio rango de pH, exhibiendo elevados recuentos aún cuando se ensayaron condiciones extremas de pH. Los mayores valores de infectividad para los 4 fagos fueron observados en el rango entre 5 y 11. Si bien el fago B1, en este rango, siempre evidenció la menor viabilidad, la misma fue alta ya que el 80% de las partículas fágicas iniciales mantuvieron la capacidad de infectar a su cepa sensible luego del ensayo (Figura 26).

A pH 4, se observó menor resistencia fágica, obteniéndose valores de viabilidad del 76% para los fagos B1 y FAGK2, 65% para el fago B2 y 58% para el fago FAGK1.

La menor infectividad fágica a pH 3 fue exhibida por los fagos B1 y B2 (< 3%) mientras que para los fagos FAGK1 y FAGK2 fueron obtenidos valores de 16 y 10% respectivamente.

Las suspensiones virales fueron inactivadas completamente luego de 30 min a pH 2 (datos no mostrados).

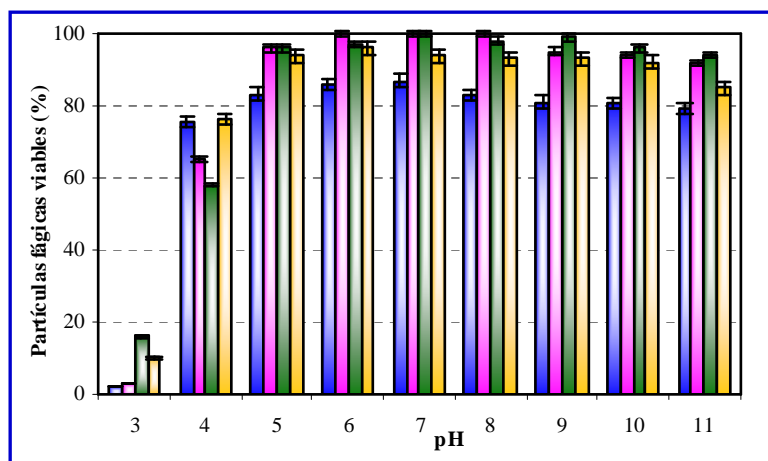


Figura 26. Efecto del pH sobre la viabilidad (luego de 30 min en caldo MRS adicionado de 10 mM de CaCl_2) de los fagos B1 (■), B2 (■), FAGK1 (■), FAGK2 (■) a 37°C. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

1.5. Viabilidad a distintas temperaturas

La infectividad de las suspensiones fágicas fue mantenida aún a 50°C. Más del 90% de las partículas fágicas iniciales permanecieron viables luego de 30 min de tratamiento en caldo MRS (Figura 27).

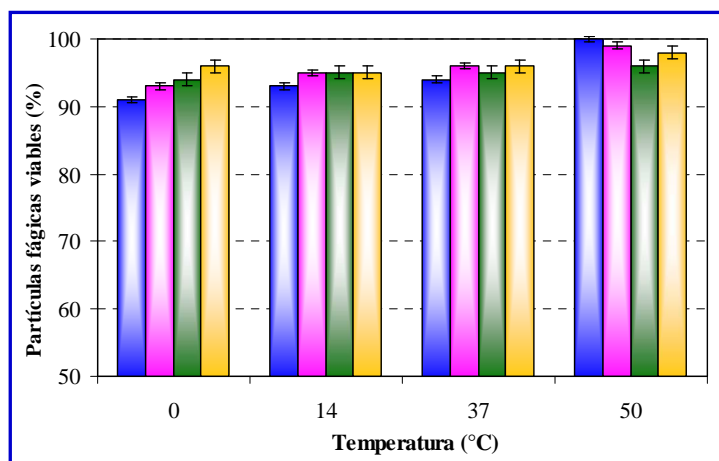


Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad (luego de 30 min en caldo MRS adicionado de 10 mM de CaCl_2) de los fagos B1 (■), B2 (■), FAGK1 (■), FAGK2 (■). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2. Interacción de *Lactobacillus plantarum* con sus fagos específicos

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

2.1.1. Lisis en medio líquido

Los 4 fagos (B1, B2, FAGK1 y FAGK2) lisaron a su cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 de manera simultánea, no pudiendo ser observadas diferencias en los tiempos de lisis de los diferentes fagos en cada una de las condiciones ensayadas.

Si bien la lisis del cultivo en caldo MRS en ausencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} se produjo para los 4 fagos, el proceso de lisis ocurrió de forma más veloz en presencia de alguno de los cationes. Comparando los dos cationes utilizados, la lisis ocurrió más rápidamente en

presencia de iones calcio. Para poder observar la lisis del cultivo en ausencia de iones, fue necesario llevar a cabo un segundo repique mientras que en presencia de alguno de ellos, la lisis se evidenció en el primer repique.

2.1.2. Formación de placas de lisis en medio sólido

En la Figura 28 se muestran las placas de lisis obtenidas en las tres condiciones para el fago B1. Para los fagos restantes (B2, FAGK1 y FAGK2), la morfología de las placas de lisis obtenidas fue similar.

En presencia de calcio, las placas de lisis mostraron elevada nitidez (Figura 28A). Sin embargo, cuando se ensayaron los iones Mg^{2+} , se evidenciaron placas de lisis muy difusas y más pequeñas que en presencia de iones Ca^{2+} (Figura 28B). Además, se observó disminución en los recuentos obtenidos en estas condiciones con respecto a los alcanzados en presencia de calcio. Las caídas en los títulos fueron de 0,4 (fago FAGK2), 0,5 (FAGK1), 0,6 (fago B2) o 0,7 (fago B1) órdenes logarítmicos.

En ausencia de cationes, las placas de lisis fueron extremadamente difusas o en algunos casos, imposibles de detectar. Las mismas se visualizaron como un puntillado, no siendo posible la determinación del número exacto de partículas fágicas. Sólo fue posible estimar el orden en el cual se encontraban, obteniéndose disminuciones en los recuentos de aproximadamente 5 órdenes logarítmicos con respecto a los obtenidos en presencia de calcio (Figura 28C).

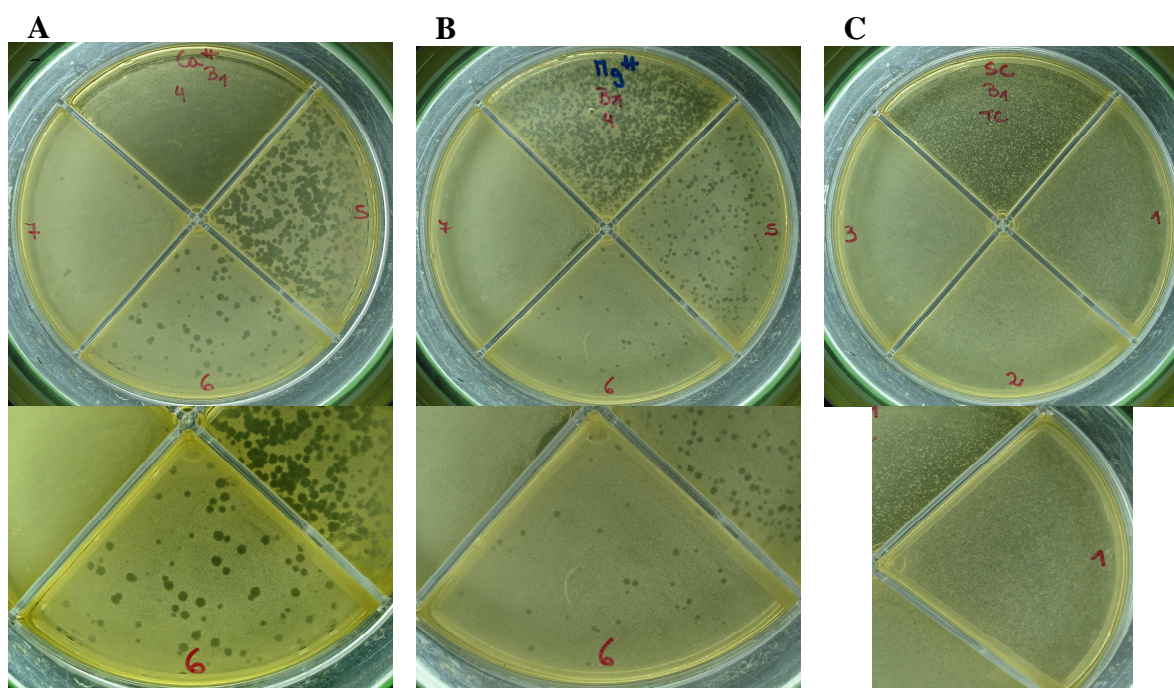


Figura 28. Placas de lisis del fago B1 obtenidas sobre *Lb. plantarum* ATCC 8014 en presencia de calcio (A), magnesio (B) y en ausencia de cationes (C).

2.2. Determinación del espectro de hospedadores

Como puede observarse en la Tabla 9, de las 16 cepas estudiadas, el fago B2 demostró ser infectivo de 10 de ellas. Las cepas ATCC 8014 y O36 fueron sensibles a los 4 fagos estudiados.

Los resultados obtenidos con el spot test fueron completamente coincidentes con los del test de turbidez. Aún las cepas LMG922 y WCSF1 que resultaron sensibles al fago B1 luego del 4° repique, fueron capaces de evidenciar zonas de lisis celular en medio sólido.

Tabla 9. Rango de huéspedes de fagos específicos de *Lb. plantarum*.

Cepa	Sensibilidad frente a los fagos			
	B1	B2	FAGK1	FAGK2
ATCC 8014	+	+	+	+
3G-112	-	+	-	-
O36	+	+	+	+
LMG9211	+ (4°)	-	-	-
PLN	-	+	-	-
WCSF1	+ (4°)	-	-	-
29	-	+	-	-
33	-	+	-	-
87	-	+	-	-
89	-	+ (2°)	-	-
91	-	+	-	-
SMQ-1112	-	+	ND	ND
SMQ-1113	-	-	ND	ND
SMQ-1114	-	-	ND	ND
SMQ-1115	-	-	ND	ND
SMQ-1116	-	-	ND	ND

+ sensible; – resistente; según test de turbidez (n° repique, si la lisis no se produjo en primer repique) y spot test.

2.3. Ciclos de multiplicación fágica (Burst size)

Los parámetros de multiplicación fágica fueron calculados a partir de las curvas de crecimiento en un paso (Figura 29).

Los fagos de colección (B1 y B2) presentaron el mismo tiempo de burst (90 min) mientras que para los fagos FAGK1 y FAGK2 el mismo fue de 80 min. El tiempo de latencia

estuvo comprendido entre 20 y 40 min para los 4 fagos. Los fagos B2, FAGK1 y FAGK2 presentaron valores de burst size bajos (10,8 - 39 UFP/centro de infección) mientras que para el fago B1 el mismo fue de 133 UFP/centro de infección (Tabla 10).

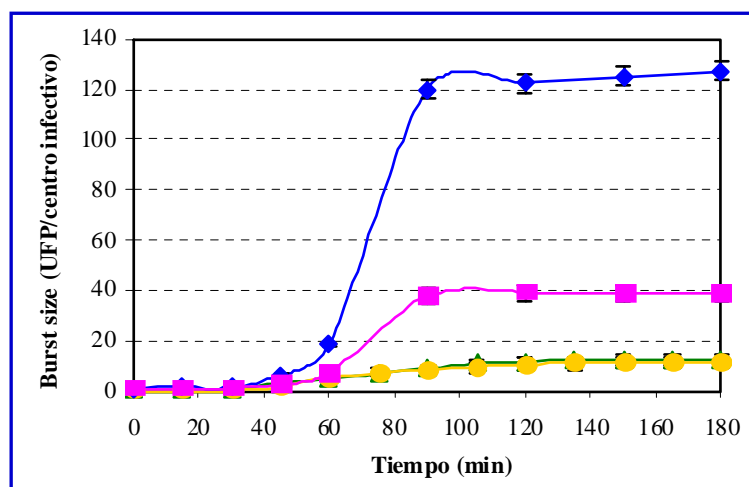


Figura 29. Curvas de crecimiento en un paso para los fagos B1 (◆), B2 (■), FAGK1 (▲) y FAGK2 (●) sobre la cepa hospedadora *Lb. plantarum* ATCC 8014. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Tabla 10. Parámetros de multiplicación de fagos de *Lb. plantarum*. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Cepa hospedadora	Fago	Período de latencia (min)	Tiempo de burst (min)	Burst size (UFP/centro de infección)
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	B1	20 \pm 3	90 \pm 4	133 \pm 9
	B2	40 \pm 4	90 \pm 2	39 \pm 3
	FAGK1	30 \pm 2	80 \pm 3	12 \pm 2
	FAGK2	30 \pm 3	80 \pm 2	10,8 \pm 1

2.4. Caracterización de la adsorción

Las cinéticas de adsorción de los fagos B1 y B2 sobre las cepas de *Lb. plantarum* ATCC 8014, WCSF1, LMG9211 y PLN se muestran en la Figura 30.

A los 15 min de incubación se obtuvieron valores de adsorción superiores al 90% para los fagos B1 y B2 sobre *Lb. plantarum* ATCC 8014. El mismo comportamiento fue observado para el sistema PLN/B2 ya que fueron alcanzadas adsorciones de 93% (15 min) y 99% (45 min). Sin embargo, el fago B1 no fue capaz de adsorberse sobre la cepa resistente *Lb. plantarum* PLN. En estas condiciones se evidenciaron valores de adsorción de 5% a los 45 min. Por lo tanto, el mecanismo de fagorresistencia involucrado para este sistema (PLN/B1), estaría vinculado al bloqueo de la adsorción fágica.

La adsorción del fago B1 sobre sus cepas sensibles, *Lb. plantarum* WCSF1 y LMG9211 fue baja. Para el primer sistema, se obtuvieron adsorciones de 20% (15 min) y 62,8% (45 min) mientras que para el segundo sistema la adsorción fue nula aún luego de los 45 min de incubación. El fago B2 se adsorbió en bajos niveles sobre la cepa resistente, *Lb. plantarum* WCSF1 (29,9% a los 45 min) mientras que sobre la cepa *Lb. plantarum* LMG9211 (resistente a dicho fago), la adsorción fue elevada (88,3% a los 45 min). En estos casos, los mecanismos de fagorresistencia actuarían en la etapa de adsorción (sistema WCSF1/B2) mientras que para el sistema LMG9211/B2, lo haría en una etapa posterior.

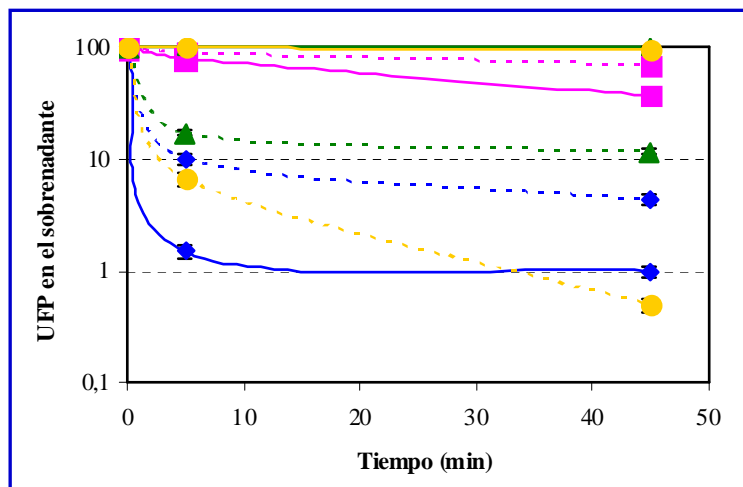


Figura 30. Cinéticas de adsorción en caldo MRS-Ca de los fagos B1 (—) y B2 (----) sobre cepas de *Lb. plantarum*: ATCC 8014 (◆), WCSF1 (■), LMG9211 (▲) y PLN (●). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Con respecto a las cepas SMQ-1112, SMQ-1113, SMQ-1114, SMQ-1115 y SMQ-1116, se puede observar que, en general, las tasas de adsorción de los fagos B1 y B2 fueron bajas (Tabla 11). Los fagos B1 y B2 que no fueron capaces de lisar a las cepas SMQ-1113, SMQ-1114, SMQ-1115 y SMQ-1116, evidenciaron bajas tasas de adsorción sobre ellas por lo que el mecanismo de fagorresistencia estaría relacionado al bloqueo de la adsorción. Sin embargo, la cepa SMQ-1112 que resultó resistente al fago B1, evidenció una adsorción superior al 90%. En este caso el mecanismo de fagorresistencia involucrado actuaría en una etapa posterior a la adsorción fágica. El fago B2, capaz de lisar a la cepa SMQ-1112, se adsorbió sobre la superficie celular en bajos porcentajes (14%).

Cepa	Φ B1	Φ B2
ATCC 8014	99,6±4,8	90,8±3,0
SMQ-1112	94,7±3,7	14,1±2,8
SMQ-1113	1,1±0,7	14,4±5,9
SMQ-1114	11,7±3,0	5,2±2,3
SMQ-1115	4,3±1,6	9,5±2,5
SMQ-1116	10,4±6,4	13,7±3,6

Tabla 11. Tasas de adsorción (37°C, 15 min) de los fagos B1 y B2 sobre cepas de *Lb. plantarum*. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2.4.1. Adsorción del fago B1 sobre *Lactobacillus plantarum* WCSF1 y LMG9211

Estos sistemas se comportaron de un modo muy particular ya que si bien el fago B1 es capaz de producir placas de lisis sobre ambas cepas, aunque con una eficiencia de plaqueo reducida con respecto a *Lb. plantarum* ATCC 8014 (EOP comprendidos entre $1,5 \times 10^{-2}$ y $4,0 \times 10^{-3}$), la lisis celular en medio líquido se evidencia luego del 4° repique y la adsorción a los 45 min de incubación resulta baja.

En razón de los resultados obtenidos, se decidió llevar a cabo una experiencia de adsorción por un período de tiempo prolongado (5 hs) para ambos sistemas. Como medio de suspensión se utilizó buffer TMG adicionado de CaCl_2 (10 mM) para evitar la multiplicación de las células bacterianas lo cual podría permitir la eventual propagación de las partículas fágicas durante el experimento.

En estas condiciones, el fago B1 se adsorbió eficazmente sobre la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014, alcanzándose valores de 99% a los 60 min de incubación. En iguales condiciones, 6% y 50% de las partículas fágicas iniciales fueron adsorbidas sobre *Lb. plantarum* WCSF1 y LMG9211 respectivamente. A las 3 hs, la adsorción aumentó a 87% (sobre *Lb. plantarum* WCSF1) y 92% (*Lb. plantarum* LMG9211), obteniéndose finalmente adsorciones de 98% a las 5 hs para ambos sistemas (Figura 31).

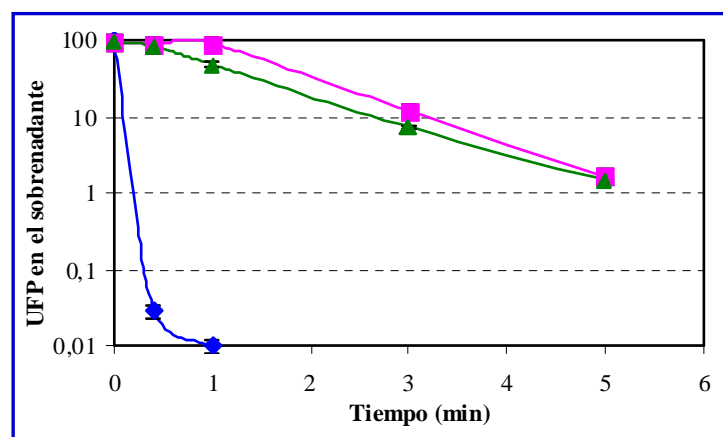


Figura 31. Cinéticas de adsorción en buffer TMG-Ca del fago B1 sobre cepas de *Lb. plantarum*: ATCC 8014 (◊) WCSF1 (■) y LMG9211 (▲). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2.4.2. Influencia del calcio

Como se observa en la Figura 32A, en general el calcio no tuvo una influencia sobre la adsorción de los fagos B1, B2, FAGK1 y FAGK2. Luego de 15 min de incubación, más del 99% de las partículas fágicas fueron adsorbidas sobre la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 en caldo MRS con y sin CaCl₂. Los máximos valores de adsorción fueron obtenidos a los 45 min de incubación (> 99,6%).

2.4.3. Influencia de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la adsorción fágica se muestra en la Figura 32B. Más del 82% de las partículas fágicas fueron adsorbidas luego de 30 min en todas las condiciones estudiadas, excepto a 50°C. A esta temperatura las tasas de adsorción solo alcanzaron valores de 38% (fagos B1, B2 y FAGK2) y 25 % para el fago FAGK1.

Los máximos valores de adsorción (> 99%) fueron logrados en un rango de temperatura de entre 30 y 42°C para los cuatro fagos estudiados.

Por debajo de 30°C, la adsorción fue levemente afectada. A 10°C y 20°C, entre el 92,7 y 95,1% de las partículas fágicas iniciales fueron adsorbidas luego de 30 min. A 0°C se obtuvieron menores tasas de adsorción, 82% (fago B1) y valores cercanos a 90% para los fagos B2, FAGK1 y FAGK2.

La viabilidad de la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 no fue influenciada cuando suspensiones celulares fueron tratadas dentro de un rango de temperatura de entre 0°C y 50°C durante 30 min (datos no mostrados).

2.4.4. Influencia del pH

La Figura 32C muestra que los mayores valores de adsorción sobre *Lb. plantarum* ATCC 8014 fueron obtenidos en un rango de pH de 5 a 7, obteniéndose valores de 99,9% para los 4 fagos (B1, B2, FAGK1 y FAGK2). A pH 8, los valores estuvieron comprendidos entre 86,6% (fago FAGK1) y 94,1% (fago B2).

Cuando se trabajó en condiciones de pH de 9 y 10, se observó una importante caída en las tasas de adsorción. A pH 9, la adsorción varió entre 23% (fago B1) y 45% (fago B2) mientras que a pH 10 solamente alrededor del 20% (fagos B2 y FAGK1) y 5% (fagos B1 y FAGK2) de las partículas fágicas fueron adsorbidas luego de 30 min.

La viabilidad de la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 no fue afectada a diferentes valores de pH (5-10) y los recuentos celulares se mantuvieron sin variación luego de los 30 min en las diferentes condiciones (datos no mostrados).

2.4.5. Influencia de un tratamiento térmico sobre la célula bacteriana

Se observaron diferencias en las tasas de adsorción cuando este proceso se determinó en células a las cuales se les aplicó un tratamiento térmico que ocasionó la pérdida de viabilidad de las mismas, en comparación a los obtenidos sobre células sin tratar (viables) (Figura 32D). A los 5 min, se obtuvieron tasas de adsorción mayores al 95% (células viables) mientras que cuando se trabajó con células muertas, las tasas oscilaron entre 70% y 80%. A los 45 min de incubación, las partículas fágicas adsorbidas (sobre células no viables) aumentaron a valores comprendidos entre 76 y 91% mientras que más del 99% fueron adsorbidas sobre células viables. De los cuatro fagos estudiados, la adsorción del fago FAGK1 fue la más afectada por el tratamiento térmico aplicado sobre las células obteniéndose valores de adsorción de 76 % a los 45 min.

2.4.6. Influencia del estado fisiológico celular

La concentración de cloranfenicol utilizada en este experimento fue 20 µg/ml. En estas condiciones, la inhibición de la síntesis proteica se mantuvo luego de que el antibiótico fuera removido. Por lo tanto, la adsorción fue llevada a cabo en ausencia del antibiótico.

Cuando las células fueron tratadas con cloranfenicol, no se observó influencia en los valores de adsorción con respecto a los obtenidos sobre células no tratadas. Luego de 30 min de incubación, entre el 90 y 99% de las partículas fágicas iniciales fueron adsorbidos sobre células tratadas y no tratadas (Figura 33).

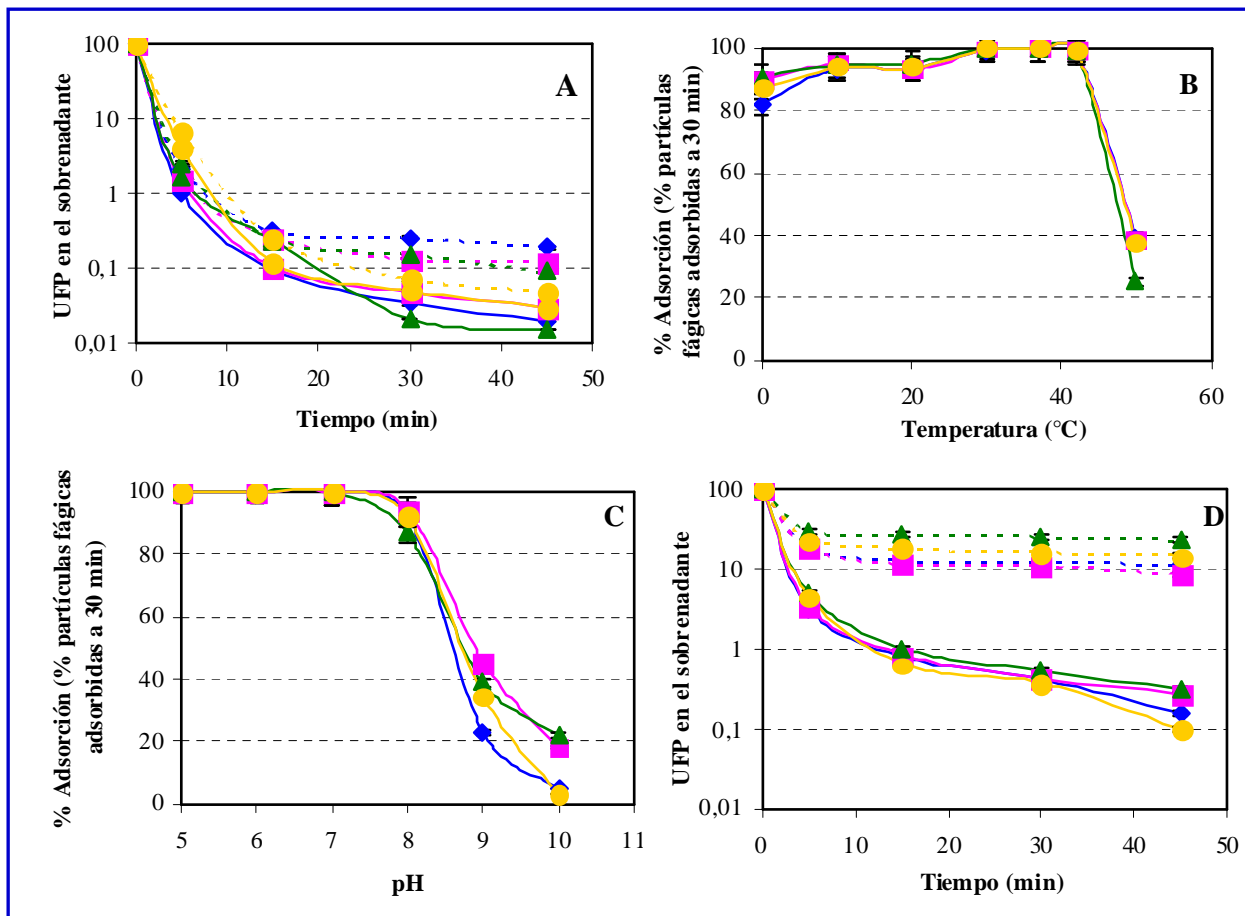


Figura 32. Efecto de parámetros fisicoquímicos en la adsorción de los fagos B1 (♦), B2 (■), FAGK1 (▲) y FAGK2 (●) sobre células de *Lb. plantarum* ATCC 8014. **A)** Adsorción en caldo MRS con (—) y sin (----) Ca^{2+} (10 mM). **B)** Adsorción luego de 30 min en caldo MRS-Ca a distintas temperaturas. **C)** Adsorción en caldo MRS-Ca a distintos valores de pH. **D)** Adsorción en caldo MRS-Ca sobre células viables (—) y no viables (----). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

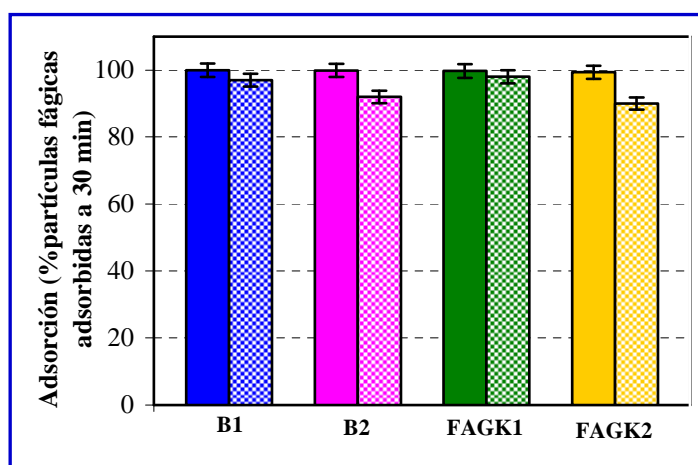


Figura 33. Influencia del estado fisiológico celular en la adsorción de los fagos B1 (♦), B2 (■), FAGK1 (▲) y FAGK2 (●) sobre células de *Lb. plantarum* ATCC 8014. Estudios realizados en caldo MRS-Ca luego de 30 min usando células no tratadas (■) y tratadas (◐) con 20 μ g/ml de cloranfenicol. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2.5. Evidencia de sistemas Restricción/Modificación en *Lactobacillus plantarum*

Para los sistemas (cepa sensible/fago) WCSF1/B1, LMG9211/B1 y PLN/B2 fue calculada la eficiencia de plaqueo (Tabla 12). Los recuentos del fago B2 sobre la cepa *Lb. plantarum* PLN fueron similares a los obtenidos sobre la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 (EOP = 1). Sin embargo, los sistemas WCSF1/B1 y LMG9211/B1 evidenciaron EOP reducidos ($1,5 \times 10^{-2}$ y $4,0 \times 10^{-3}$, respectivamente), por lo tanto, para ellos se continuó con el estudio de determinación de la presencia de mecanismos R/M. Cuando los fagos fueron propagados sobre la correspondiente cepa restrictiva y posteriormente titulados, se obtuvieron valores de EOP cercanos a la unidad (Tabla 12). Esto sugeriría que los fagos se modificaron al ser propagados sobre la correspondiente cepa restrictiva (*Lb. plantarum* WCSF1 y LMG9211) evidenciando la presencia de mecanismos de fagoresistencia del tipo R/M en ambas cepas.

Para probar la reversibilidad de la modificación, los fagos potencialmente modificados (B1Wm y B1Lm) fueron propagados sobre la cepa hospedadora (*Lb. plantarum* ATCC 8014) y titulados. Los valores de EOP, luego de este pasaje, se redujeron a valores cercanos a los obtenidos luego del primer pasaje (Tabla 12). Este comportamiento evidencia que los fagos se propagarían normalmente sobre la cepa hospedadora, perdiendo la modificación.

En la Figura 34 se presentan las placas de lisis obtenidas en los diferentes casos sobre las cepas *Lb. plantarum* ATCC 8014 y WCSF1. La morfología de las placas de lisis sobre *Lb. plantarum* LMG9211 fue similar a la obtenida sobre *Lb. plantarum* WCSF1. En las Figuras 34A y 34C se observa la reducción en los recuentos cuando los fagos (B1 y B1Wm-d) fueron titulados sobre la cepa restrictiva *Lb. plantarum* WCSF1 (A-2 y C-2) en comparación a los obtenidos sobre la cepa hospedadora *Lb. plantarum* ATCC 8014 (A-1 y C-1). Sin embargo, en la Figura 34B se puede observar que los títulos del fago modificado (B1Wm) sobre la cepa hospedadora y la restrictiva fueron similares. En los tres casos, las placas de lisis obtenidas sobre la cepa restrictiva fueron más grandes y más claras que las obtenidas sobre *Lb. plantarum* ATCC 8014.

Tabla 12. Evidencia de mecanismos de fagorresistencia del tipo R/M en cepas de *Lb. plantarum*.

Cepa restrictiva / Cepa hospedadora*	Fago	Estadío del ensayo	UFP/ml	EOP ^a
WCSF1 ATCC 8014*	B1	1°	1,5x10 ⁸ 9,5x10 ⁹	1,5x10 ⁻²
WCSF1 ATCC 8014*	B1Wm ^b	2°	2,8x10 ⁹ 2,8x10 ⁹	1
WCSF1 ATCC 8014*	B1Wm-d ^c	3°	1,2x10 ⁷ 1,0x10 ⁹	1,2x10 ⁻²
LMG9211 ATCC8014*	B1	1°	4,0x10 ⁷ 9,5x10 ⁹	4,0x10 ⁻³
LMG9211 ATCC8014*	B1Lm ^b	2°	1,0x10 ⁹ 1,0x10 ⁹	1
LMG9211 ATCC8014*	B1Lm-d ^c	3°	1,3x10 ⁷ 1,0x10 ¹⁰	1,3x10 ⁻³
PLN ATCC8014*	B2	1°	2,3x10 ⁹ 2,3x10 ⁹	1

a: Eficiencia de plaqueo.

b: Fago modificado (m) obtenido por propagación del fago lítico sobre la cepa restrictiva.

c: Fago desmodificado (m-d) obtenido por propagación del fago modificado sobre la cepa hospedadora.

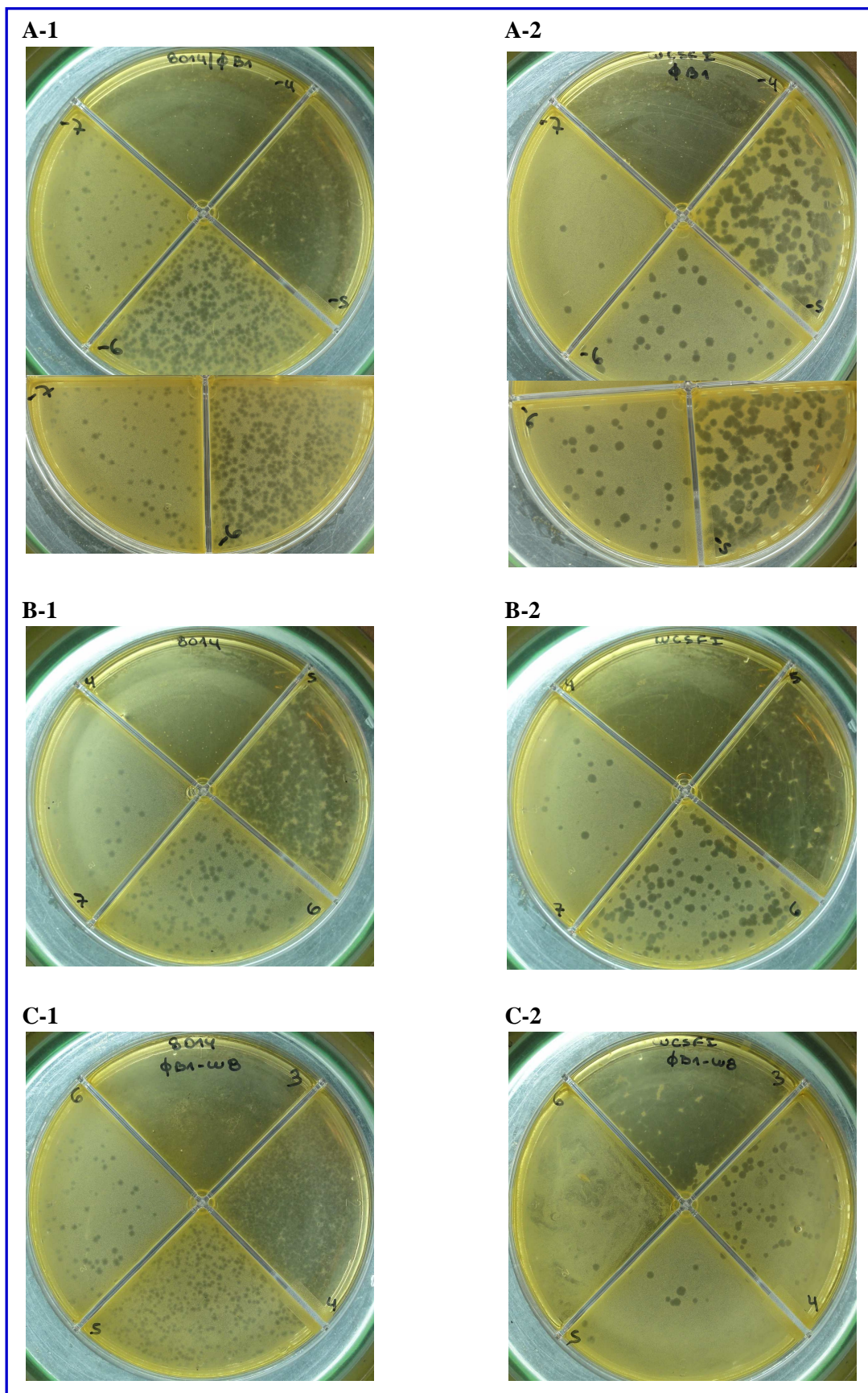


Figura 34. Placas de lisis de los fagos B1 (A), B1Wm (B) y B1Wm-d (C) sobre cepas de *Lb. plantarum* ATCC 8014 (1) o WCSF1 (2).

2.6. Estudios sobre paredes celulares

La eficiencia de ruptura celular fue monitoreada por recuento bacteriano en placa (microtécnica), y se midió como la disminución en la concentración de células viables (enteras) luego de la etapa de disrupción mecánica, obteniéndose reducciones de 5 órdenes logarítmicos para *Lb. plantarum* ATCC 8014.

Los recuentos celulares del sobrenadante obtenido luego de la centrifugación realizada para separar células enteras y detritus de paredes celulares fueron menores a 10 UFC/ml. Esto confirma la eficiencia de la centrifugación para lograr el mencionado objetivo.

Al realizar los ensayos para estudiar la adsorción sobre paredes celulares, en primer lugar se observó que en ningún caso fue necesaria la viabilidad celular para la ocurrencia de esta etapa, ya que las adsorciones siempre fueron superiores a 90% sobre paredes control (sin tratamiento). Sin embargo, estos valores de adsorción se obtuvieron únicamente cuando las paredes celulares se utilizaron sin dilución por lo que las mismas se utilizaron en dichas condiciones en todos los ensayos.

2.6.1. Ensayos de adsorción sobre paredes tratadas química y enzimáticamente

En cuanto a los tratamientos químicos y enzimáticos, en general se observaron disminuciones significativas en los porcentajes de adsorción para las paredes tratadas con mutanolisina y TCA, mientras que para tratamientos con proteinasa K y SDS los valores fueron muy similares a los obtenidos para las paredes control (Tabla 13).

La proteinasa K hidroliza uniones peptídicas y el SDS (1%) remueve y desnaturaliza las proteínas de la pared celular, sin afectar al PG ni a las moléculas ligadas covalentemente a él. Las tasas de adsorción para todos los fagos luego de la aplicación de estos tratamientos disminuyeron entre 0,5% y 7% (proteinasa K) y entre 0,2% y 6% (SDS) con respecto a los obtenidos para las paredes control. De los cuatro fagos estudiados, los fagos FAGK1 y FAGK2 demostraron mayores diferencias en los valores de adsorción entre células tratadas y no tratadas.

La mutanolisina es una enzima que hidroliza el PG de la pared celular. Su aplicación sobre las paredes produjo importantes disminuciones en las adsorciones, obteniéndose para todos los sistemas tasas de adsorción inferiores a 38%. El tratamiento con TCA (5%) actúa sobre componentes de naturaleza hidrocarbonada, removiendo una fracción soluble de los polisacáridos, mientras que, en la pared, permanecen una fracción insoluble y los ácidos teicoicos (Callegari, 1992). Frente a este tratamiento, los sistemas mostraron las menores

tasas de adsorción (inferiores al 15%). Las disminuciones observadas indicarían la existencia de componentes de origen hidrocarbonado en los receptores fágicos.

Tabla 13. Adsorción (caldo MRS-Ca, 30 min a 37°C) de fagos sobre paredes celulares de *Lb. plantarum* ATCC 8014 tratadas química y enzimáticamente. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Tratamiento	Adsorción fágica (%)			
	Fagos			
	B1	B2	FAGK1	FAGK2
Control	98 \pm 0,5	95 \pm 1,0	97 \pm 1,2	98,8 \pm 1,4
Proteínasa K 0.10mg/ml (30 min, 37°C)	97 \pm 0,4	94,5 \pm 0,9	93 \pm 0,8	91,9 \pm 2,8
SDS 1% (30 min, 37°C)	97 \pm 0,6	94,8 \pm 1,1	96,7 \pm 0,9	93,4 \pm 1,9
Mutanolisina 50 U/ml (30 min, 37°C)	38 \pm 0,5	14 \pm 0,5	0	23 \pm 1,0
TCA 5% (15 min, 100°C)	15 \pm 0,8	2,8 \pm 0,4	1,7 \pm 0,3	0

2.6.2. Reversibilidad de la adsorción fágica sobre paredes celulares purificadas

A los 30 min se obtuvieron tasas de adsorción mayores al 95% para los cuatro sistemas estudiados. Luego de ese tiempo, los recuentos se mantuvieron prácticamente invariables. Esto indica que no existe una tendencia a la desorción espontánea de las partículas fágicas desde los receptores situados en las paredes, durante el tiempo evaluado en el ensayo (Figura 35).

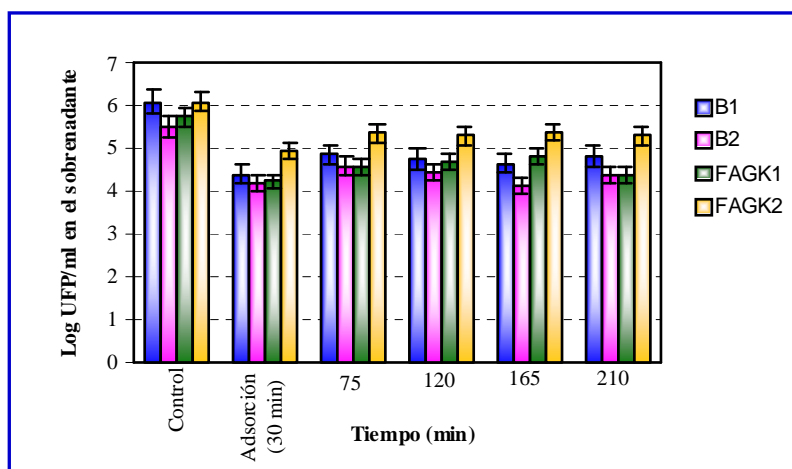


Figura 35. Irreversibilidad de la adsorción fágica a paredes celulares puras de *Lb. plantarum* ATCC 8014 (fagos libres en el sobrenadante luego de la adsorción, 30 min a 37°C en caldo MRS-Ca). Las barras identificadas como “control” representan las concentraciones de fagos iniciales puestas en contacto con las paredes celulares. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2.6.3. Identificación de receptores fágicos en *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Para la identificación de los azúcares que componen los receptores fágicos en *Lb. plantarum* ATCC 8014 se llevaron a cabo tres metodologías:

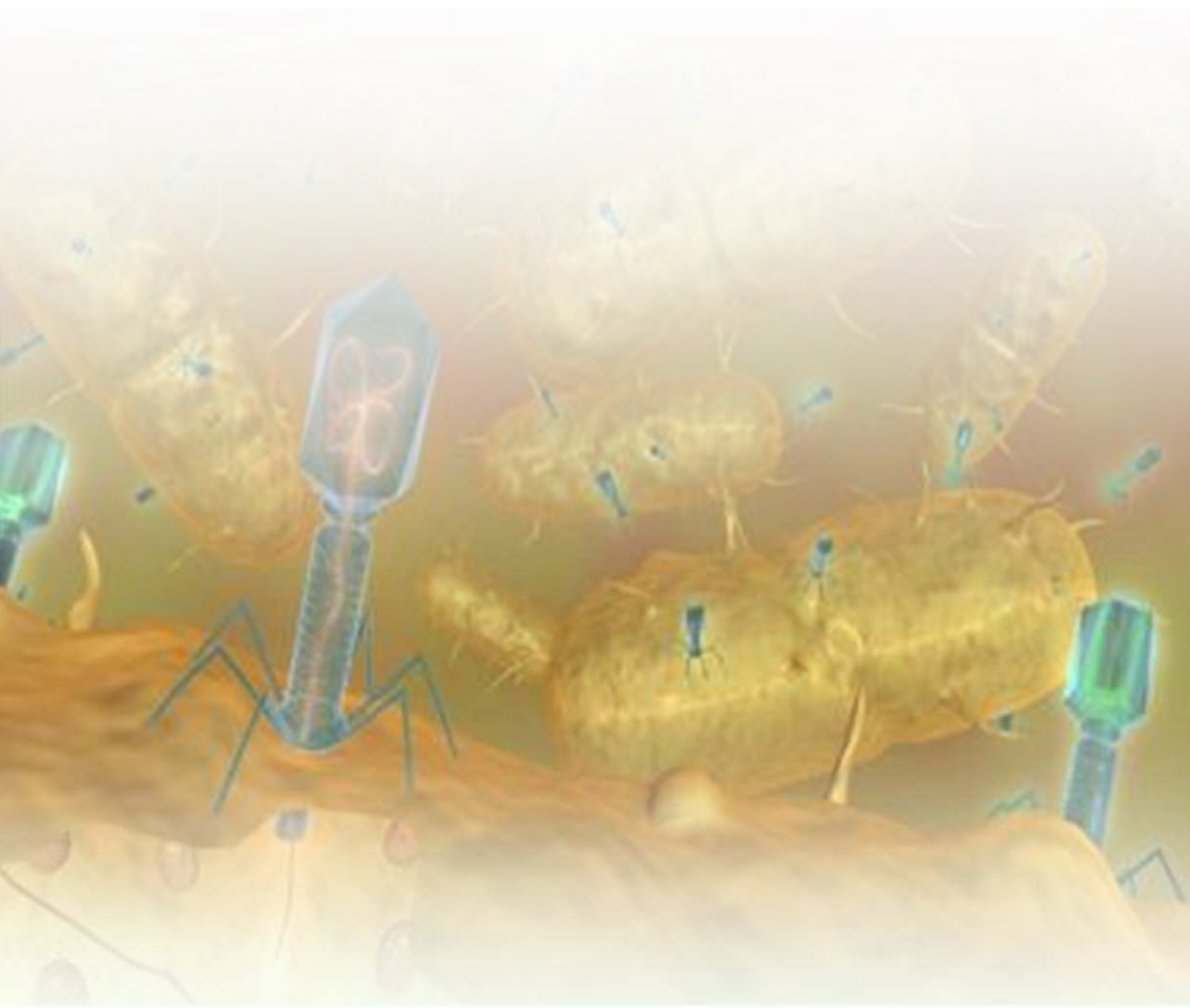
- Ensayos de neutralización de fagos con monosacáridos
- Ensayos de desorción y competencia con monosacáridos
- Ensayos con lectinas

Los resultados obtenidos mediante la neutralización de fagos con monosacáridos fueron muy variables y no reproducibles para ninguno de los cuatro fagos estudiados (datos no mostrados), por lo que esta técnica no arrojó información acerca de los monosacáridos que podrían ejercer un efecto neutralizante de las partículas fágicas.

En los ensayos de competencia y desorción se observó una pequeña influencia de los azúcares en la adsorción fágica. Sin embargo, no fue posible identificar el o los azúcares intervinientes ya que la adsorción fue disminuida en presencia de los tres monosacáridos (galactosa, ribosa o fructosa), no encontrando diferencias en el comportamiento entre ellos (datos no mostrados).

Cuando se ensayaron las lectinas específicas de β -galactosa, N-acetil- α -D-galactosamina y α -D-glucosa, no fue posible obtener resultados repetitivos ni concluyentes. Para el sistema *Lb. casei* ATCC 27092/ Φ PL-1, que fue utilizado como control para la puesta a punto de la técnica, se observó una reducción en la tasa de adsorción en presencia ConA (55%) y de la lectina aislada de *Wisteria floribunda* (77%) en comparación a los obtenidos por el control (82%). Sin embargo, cuando la lectina de *Arachis hypogaea* fue ensayada, las partículas fágicas se adsorbieron en niveles similares al control (84%). Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por Ishibashi y col. (1982), para dicho sistema de *Lb. casei*. Por lo tanto, la puesta a punto de la técnica fue correcta.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

El tamaño del genoma del fago B1 (38 kb) fue similar al de otros fagos específicos de *Lb. plantarum* y pertenecientes a la familia *Siphoviridae*: JL-1 (36,7 kb) (Lu y col., 2005), Sha1 (41,7 kb) (Yoon y col., 2011) g1e (42 kb) (Kodaira y col., 1997), LP2 (47 kb) (Caso y col., 1995). El tamaño del material genético del fago B2 (80,6 kb) fue mayor y compatible con el del fago LP1 (*Lb. plantarum*) (80 kb) (Caso y col., 1995). Nes y col. (1988) reportaron un menor tamaño del genoma para el fago B2 (73 kb) pero la diferencia puede deberse a que en ese estudio fue estimado a través de la sumatoria de los fragmentos generados por enzimas de restricción. Por otro lado, el genoma del fago SC921 (*Lb. plantarum*) presentó un tamaño intermedio (66,5 kb) (Yoon y col., 2001) mientras que los fagos de la familia *Myoviridae*, fri y LP65 evidenciaron tamaños de genoma superiores (133 y 131 kb, respectivamente). La estructura morfológica más compleja que poseen las partículas fágicas pertenecientes a esta familia de fagos (*Myoviridae*) podría ser la razón de la diferencia en el tamaño de sus genomas (Trevors y col., 1983; Chibani-Chennoufi y col., 2004).

El contenido de GC del fago B2 (36,9%) fue inferior al del fago B1 (47,6%) y resultó similar al reportado por Nes y col. (1988). De manera similar, el fago LP65 mostró un contenido de GC de 37% (Chibani-Chennoufi y col., 2004). Otros fagos de *Lb. plantarum*, evidenciaron valores intermedios de 39% (fagos JL-1 y SC921), 40,6% (Sha1) (Yoon y col., 2011) y 43% (g1e) (Kodaira y col., 1997; Yoon y col., 2001; Lu y col., 2005).

Teniendo en cuenta el tipo de empaquetamiento del material genético, los fagos se pueden clasificar en *cos* o *pac*. De acuerdo al secuenciamiento de los genomas fágicos, el fago B1 evidenció un mecanismo de empaquetamiento de su ADN del tipo *pac*. Otros fagos de *Lb. plantarum* que evidenciaron este mecanismo de empaquetamiento son los fagos fri, JL-1 y LP65 (Trevors y col., 1983; Chibani-Chennoufi y col., 2004; Lu y col., 2005). Sin embargo, el fago B2 fue clasificado como *cos* al igual que el fago SC921 (Yoon y col., 2001).

Para el fago B1 se identificaron 60 ORFs mientras que para el fago B2 fueron encontrados 127 ORFs, posiblemente debido al gran tamaño genómico de este último. Los fagos JL-1 y g1e, cuyos genomas son similares en tamaño al del fago B1, evidenciaron 52 y 62 ORFs, respectivamente (Kodaira y col., 1997; Lu y col., 2005). En tanto que para el fago LP65, cuyo genoma está integrado por 131 kb, fueron identificados 165 ORFs (Chibani-Chennoufi y col., 2004).

La presencia de ARNt en los genomas fágicos es reciente en la historia de evolución fágica, pero parece ser común principalmente en genomas grandes, como es el caso del fago

B2 donde se identificaron 6 ARNt. Si bien es difícil determinar su origen, se podría pensar que su adquisición es necesaria para la adaptación del fago (Samson y Moineau, 2010). Teniendo en cuenta las frecuencias de utilización de codones, tanto por parte del fago B2 como por parte de cepas de *Lb. plantarum*, podría hipotetizarse que la presencia de ARNt en el genoma del fago B2 se debe a que la síntesis de proteínas fágicas involucra codones pocos comunes (o que son menos utilizados por las cepas) y por lo tanto, los fagos necesitan transportar sus propios ARNt correspondientes para controlar la expresión de sus proteínas (Samson y Moineau, 2010).

De los fagos de *Lb. plantarum* secuenciados al presente, el único que evidenció ARNt, fue el fago LP65. Para dicho fago se encontraron 14 ARNt aunque no se realizó un análisis detallado sobre este aspecto (por ejemplo, frecuencia del uso de codones asociados a dichos ARNt) (Chibani-Chenouefi y col., 2004). Analizando otros fagos de bacterias lácticas, para el fago 949 (*L. lactis*) que contiene 6 ARNt no se observó diferencia en la frecuencia de utilización de los diferentes codones asociados a cada ARNt. Además, la frecuencia de utilización de codones por parte del fago y de su cepa hospedadora fue similar. Sin embargo, para este fago, al analizar la frecuencia de uso de codones para cada ORF en particular, se observó que el fago evidenció valores superiores para ciertos ORFs en comparación a los encontrados para la cepa, los cuales codificarían para proteínas esenciales del fago (Samson y Moineau, 2010).

De acuerdo al mecanismo de empaquetamiento del ADN y al ordenamiento de los genes, el fago B1 fue clasificado dentro del grupo Sfi11 al igual que los fagos de *Lb. plantarum* (JL-1, g1e y LP65) y *Lb. delbrueckii* (LL-H, mv4). En tanto, el fago B2 formaría parte del grupo Sfi21, de manera similar a los fagos A2 (*Lb. casei*), adh (*Lb. gasseri*) y Lc-Nu (*Lb. rhamnosus*) (Villion y Moineau, 2009).

Como se mencionó anteriormente, el fago B1 evidenció homología con el fago JL-1. Este último resultó similar al fago g1e, adh (*Lb. gasseri*) y al fago temperado Sfi21 (*St. thermophilus*) (Villion y Moineau, 2009). EL genoma del fago B1 estaría organizado en módulos de manera similar a lo evidenciado con el fago JL-1 (Lu y col., 2005). Por otro lado, el genoma del fago LP65 fue dividido en tres regiones: algunos genes de la región 1 (ORF5-ORF76) evidenciaron homología con genes de cepas de *Lb. plantarum* y sus fagos que previamente habían sido secuenciados, y otros participarían en la replicación del ADN (RecA, ADN polimerasa, ADN primasa, ADN helicasa y endonucleasas de recombinación), luego se encuentra una región de ARNt seguida de la región 2 (ORF88-ORF199) que codifica para proteínas estructurales (proteínas mayores de la cola y de la cápside) y otras relacionadas a la

lisis celular. En particular, se identificaron varios genes que codifican para proteínas de la cola, lo cual puede deberse a su elevada complejidad. Finalmente, se ubica la región 3 (ORF120-ORF165) para la cual no se encontró homología en la base de datos, excepto por dos HNH endonucleasas asociadas a intrones. Este fago resultó semejante a los fagos K (*Staphylococcus aureus*) y SPO1 (*Bacillus subtilis*), evidenciando la misma organización de sus genes. En particular, 32 de sus ORFs compartieron homología con ambos fagos, principalmente aquellos relacionados a genes estructurales (terminasa, proteínas portal, mayor y menor de la cápside y cola) (Chibani-Chennoufi y col., 2004).

Las enzimas HNH endonucleasas pueden participar en la replicación, recombinación, reparación o empaquetamiento del ADN fágico (Samson y Moineau, 2010). Para el fago B1, esta proteína está relacionada a aquellas que intervienen en la replicación del ADN mientras que participaría en el empaquetamiento del ADN del fago B2.

Para el fago B1 no se encontraron genes vinculados a la lisogenia, y lo mismo fue observado para el fago JL-1 (Lu y col., 2005). En contraste, para el fago B2, se evidenciaron proteínas relacionadas a profagos y a la enzima recombinasa/integrasa, al igual que para los fagos LP65 (Chibani-Chennoufi y col., 2004) y Sha1 (Yoon y col., 2011). Adicionalmente, para el fago g1e, 4 genes fueron relacionados con la conversión de la lisogenia teniendo en cuenta su localización y por alineamiento con otras secuencias de profagos (Villion y Moineau, 2009). En particular, el fago LP65 (virulento) puede infectar a cepas lisógenas como *Lb. plantarum* WCSF1, por lo que se podría suponer que este fago desafía los sistemas de exclusión de la superinfección (Chibani-Chennoufi y col., 2004).

El tamaño de las proteínas estructurales de los fagos B1 y B2 estuvo comprendido dentro de los valores reportados para otros fagos de *Lb. plantarum*, incluyendo los que forman parte de la familia *Myoviridae* (Kakikawa y col., 1996; Yoon y col., 2001; Chibani-Chennoufi y col., 2004). En particular, para el fago JL-1, un análisis detallado de sus proteínas estructurales evidenció tres bandas (34, 45 y 61 kDa) relacionadas a proteínas de la cabeza y tres bandas (28, 50 y 76 kDa) a las proteínas de la cola (Lu y col., 2003a, 2005). En un estudio previo realizado al fago B2, 4 de las 5 bandas proteicas reportadas (37; 32,5; 26; 25 y 21 kDa) en el gel SDS-PAGE, podrían corresponder, en esta Tesis, a las bandas G (35 kDa), H (30 kDa), I (28 kDa) y J (20 kDa) (Nes y col., 1988).

Al igual que algunas proteínas del fago B2, las proteínas de la cápside del fago g1e evidenciaron modificaciones postraduccionales. Estas proteínas presentaron ausencia de la metionina del extremo N-terminal, lo cual concuerda con la regla que determina que esta metionina es generalmente procesada cuando el segundo aminoácido es alanina. Estas

proteínas presentaron residuos de aminoácidos ácidos y su pI estuvo comprendido entre 4,70 y 4,85 (Kakikawa y col., 1996). El mismo comportamiento fue observado para determinadas proteínas del fago JL-1 (Lu y col., 2005). Además del clivaje, algunas proteínas pueden formar multímeros, lo cual puede observarse comúnmente en las proteínas mayores de la cápside (Samson y Moineau, 2010).

Los fagos B1 y B2 pertenecen a la familia *Siphoviridae* (Ackermann, 2009) al igual que la mayoría de los fagos que infectan a *Lb. plantarum*: LP1 y LP2 (Caso y col. 1995), gle (Kakikawa y col., 1996), SC921 (Yoon y col., 2001), JL-1 (Lu y col., 2003a), FAGK1, FAGK2 (De Antoni y col., 2010) y Sha1 (Yoon y col., 2011). Para estos fagos, el diámetro de la cápside fue similar al de los fagos B1 y B2 (52 - 67 nm). Sin embargo, la longitud de la cola de los fagos SC921, LP1, LP2, gle y Sha1 fue superior y estuvo comprendida entre 260 y 288 nm. Nes y col. (1988) reportaron una cola relativamente larga para el fago B2 (500 nm) así como también un diámetro de cápside superior al observado en las micrografías electrónicas obtenidas durante esta Tesis. Sin embargo, las dimensiones de las partículas fágicas obtenidas a partir de mediciones realizadas sobre las micrografías electrónicas pueden variar dependiendo de la metodología utilizada en la obtención de dichas micrografías (Quiberoni y col., 2010). En contraste, los fagos LP65 y fri pertenecieron a la familia *Myoviridae* (Trevors y col., 1983; Chibani-Chennoufi y col., 2004). El fago fri evidenció un diámetro de cápside mayor (90 nm) y una longitud de la cola de dimensiones intermedias (190 nm) en comparación a los observados para los fagos de la familia *Siphoviridae* (Trevors y col., 1983). Por otro lado, hasta el momento, sólo un fago de *Lb. plantarum* (fago Y1, aislado de chucrut) fue clasificado dentro de la familia *Podoviridae* (Yoon y col., 2001, 2002). Las micrografías electrónicas revelaron la presencia de fibras en la cola del fago B1. Lo mismo fue observado para el fago gle (Kakikawa y col., 1996). Sin embargo, no fue posible distinguir las para el fago B2, aunque el secuenciamiento de su genoma reveló la presencia de un gen que codificaría para fibras de la cola, pero probablemente no se expresa. Si bien no fue posible observar la placa basal en los fagos B1 y B2, su presencia se evidenció para los fagos gle, SC921 y JL-1 (Kodaira y col., 1997; Yoon y col., 2001; Lu y col., 2003a).

Para diseñar estrategias que contribuyan a controlar las infecciones fágicas, es importante conocer la resistencia/sensibilidad de los fagos en diferentes condiciones ambientales. Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo estudios de viabilidad fágica a temperaturas de refrigeración y congelamiento. Los fagos de *Lb. plantarum* estudiados en esta Tesis mostraron elevada viabilidad a temperaturas de conservación (4°C, -20°C y -80°C) dentro de los 42 meses de estudio. En general no se encontraron diferencias en la viabilidad

cuando los fagos fueron almacenados a -20°C o a -80°C . A 4°C , la viabilidad de los cuatro fagos se redujo considerablemente en comparación a la obtenida a temperaturas de congelamiento. Para fagos de *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* y *Lb. paracasei* el comportamiento durante la conservación fue variable dependiendo del sistema estudiado (Quiberoni, 1997; Guglielmotti, 2003; Capra, 2007; Mercanti y col., 2012). En general estos fagos evidenciaron menor resistencia en comparación a la obtenida para los fagos de *Lb. plantarum*.

Continuando con los estudios de viabilidad fágica, se evaluó la resistencia de los fagos en suspensiones ajustadas a diferentes valores de pH. Guttman y col. (2005) indicaron que los fagos generalmente presentan estabilidad en un rango de pH de entre 5 y 8, aunque muchos toleran valores por debajo de 3 ó 4. Los cuatro fagos de *Lb. plantarum* exhibieron alta infectividad aún a pH 4 y 11. La viabilidad fágica fue altamente afectada sólo a valores de pH muy ácidos (pH 2 y 3). El mismo comportamiento fue observado para ciertos fagos de *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* y *Lb. paracasei* (Auad y col., 1997; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006a, 2006b). Una menor resistencia fue observada para algunos fagos de *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* y *Lb. paracasei*. En estos casos, la mayor infectividad fue lograda en el rango de pH de 5 a 7. Sin embargo, por debajo de pH 5, la viabilidad de estos fagos cayó drásticamente hasta volverse nula mientras que por encima de pH 7, su infectividad cayó levemente, siendo en algunos casos similar al valor máximo. Sin embargo, para estos sistemas, cuando los ensayos se llevaron a cabo a 25°C , el rango de pH, en el cual se observaron los mayores valores de viabilidad, fue más amplio (Binetti, 2001; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006b). Al igual que los fagos de *Lb. plantarum* estudiados en esta Tesis, el fago fri (*Lb. plantarum*) fue afectado por condiciones ácidas. A pH 7 y 8, el 90% de las partículas fágicas iniciales permanecieron infectivas. A valores de pH inferiores a 6 la viabilidad del fago fue elevada aunque fue disminuyendo de modo paulatino hasta anularse a pH 2 (Trevors y col., 1983).

La infectividad de los fagos no se vio afectada por la temperatura (entre 0°C y 50°C). En contraste, el fago fri alcanzó pérdidas de viabilidad del 25% luego de 60 min de tratamiento a 45°C (Trevors y col., 1983).

La viabilidad de la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 no fue afectada por la temperatura (0°C - 50°C) ni por el pH (5-10). La cepa hospedadora del fago fri, *Lb. plantarum* A, mostró capacidad para desarrollar en un rango de pH de 5 a 8. En este caso, a valores inferiores a 5, la capacidad de crecimiento fue disminuyendo hasta hacerse nula a pH 3 (Trevors y col., 1983). Con respecto a la influencia de la temperatura, Corsetti y Gobetti

(2003) reportaron la capacidad de cepas de *Lb. plantarum* de crecer en un amplio rango de temperaturas (aún a 10-15°C). Esto podría constituir una ventaja cuando se diseñan nuevas estrategias de control fágico en los procesos fermentativos que involucran a *Lb. plantarum* ya que se podría emplear un rango de temperatura en el cual el ciclo de infección sea retardado o disminuya su efectividad pero sin alterar el crecimiento de la cepa.

Continuando con la caracterización de los fagos de *Lb. plantarum*, se procedió a estudiar diversos aspectos de la interacción de los fagos con sus cepas específicas. En primer lugar se estudió la influencia de iones divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) en la propagación de los fagos en medio líquido y en la formación de placas de lisis en medio agarizado. Una estrategia para controlar las infecciones fágicas es el uso de medios inhibidores de fagos (Phage Inhibitory Media, PIMs), los cuales contienen agentes quelantes (fosfatos y citratos) capaces de secuestrar cationes divalentes. Si el ciclo lítico de un fago necesita de la presencia de cationes para poder completarse, el uso de PIMs podría evitar la proliferación fágica (Whitehead y col., 1993). Sin embargo, para los fagos de *Lb. plantarum*, la lisis celular ocurrió aún en ausencia de cationes, si bien en presencia de los mismos fue más rápida. Por lo tanto, el uso de PIMs no sería una estrategia válida para controlar las infecciones por parte de estos fagos. De manera similar, la propagación del fago JL-1 sobre cepas de *Lb. plantarum* evidenció el mismo comportamiento (Lu y col., 2003a). Con respecto a otras especies de bacterias lácticas, la influencia de cationes sobre la lisis celular fue dependiente del sistema estudiado, observándose variaciones en el comportamiento aún entre sistemas pertenecientes a la misma especie bacteriana (Cluzel y col., 1987; Séchaud y col., 1989; Alatossava y Klaenhammer, 1991; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Binetti y col., 2002; Capra y col., 2006a, 2006b; Quiberoni y col., 2004; Stiefel, 2000; Suárez y col., 2008a, 2008b; Wang y col., 2010).

La formación de placas de lisis sobre las cepas de *Lb. plantarum* se vio afectada por la ausencia de iones calcio, modificándose la morfología de las mismas y los valores de EOP en estas condiciones. De manera similar, sólo en presencia de este catión se obtuvieron placas de lisis claras para sistemas de *St. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* y *Lb. paracasei* (Séchaud y col., 1989; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Stiefel, 2000; Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006a, 2006b; Wang y col., 2010). Por otro lado, los iones calcio no tuvieron influencia en el tamaño de las placas de lisis de 4 sistemas de *L. lactis* (Suárez y col., 2008a) y del fago hv sobre *Lb. helveticus* ATCC 15807 (Quiberoni y Reinheimer, 1998). La temperatura de incubación (30°C o 37°C) afectó la turbidez de las placas de lisis, el diámetro y los valores de EOP para diversos sistemas de *Lb. plantarum*, previamente reportados en la bibliografía. En algunos casos, la formación de placas de lisis se

vio favorecida a 30°C. Por ejemplo, para el fago LP1-B sobre *Lb. plantarum* ATCC 10241 se obtuvieron placas de lisis de menor tamaño y menores recuentos fágicos a 37°C mientras que el efecto de la temperatura resultó más drástico para el fago fri sobre *Lb. plantarum* HER 1325 ya que no hubo producción de placas de lisis a dicha temperatura. Por el contrario, para otros sistemas, la titulación fue más eficiente a 37°C, tal es el caso de los fagos LP1-A y LP1-B sobre *Lb. plantarum* ATCC 14917. Por otro lado, estos dos fagos ensayados sobre *Lb. plantarum* ATCC 8014 produjeron iguales recuentos (UFP/ml) a ambas temperaturas, aunque a 37°C, las placas de lisis fueron más pequeñas (Caso y col., 1995). Yoon y col. (2001) reportaron que la formación de placas de lisis del fago SC921 sobre *Lb. plantarum* LA0280 se vio favorecida con el aumento de la concentración de CaCl₂ (0-25 mM); sin embargo, por encima de 25 mM, el EOP decreció. Además, para este sistema la morfología de las placas de lisis no se modificó con la temperatura (30°C o 37°C).

En esta Tesis y al igual que la mayoría de los fagos de *Lb. plantarum*, el fago de colección B1 y los fagos aislados de gránulos de kefir, mostraron una limitada capacidad de infección. El fago JL-1 no lisó ninguna de las 21 cepas de *Lactobacillus* ensayadas (Lu y col., 2003a) mientras que de 17 cepas, el fago fri lisó a sólo una de ellas (*Lb. plantarum* HER 1325), el fago LP2 a 2 y los fagos LP1-A y B resultaron infectivos de 7 de las 17 cepas estudiadas (Caso y col., 1995). Sin embargo, en esta Tesis, el fago B2 lisó al 62% de las cepas ensayadas. Un comportamiento similar fue observado para el fago SC921, el cual resultó infectivo de la mitad de las cepas estudiadas (Yoon y col., 2001). El hecho de que el fago B2 infecte a una gran cantidad de cepas podría explicarse por sus adhesinas (elementos de reconocimiento del receptor), las cuales son específicas de un fago. Las adhesinas frecuentemente son muy complejas y versátiles, capaces de reconocer receptores bastantes diferentes en bacterias distintas. Las regiones que codifican para adhesinas son las más variables dentro de los genomas fágicos (Kutter y col., 2005).

Las experiencias de crecimiento en un paso se emplean para conocer ciertos parámetros que rigen las interacciones fago/cepa. El burst size representa una medida de la eficiencia en la producción de fagos. El fago B2 evidenció un valor de burst size considerablemente mayor al de los demás mientras que los períodos de latencia y los valores de burst time fueron similares para los cuatro fagos. El elevado burst size y bajo período de latencia encontrados para este fago, podrían ser el resultado de una liberación rápida de partículas fágicas y por lo tanto ser el principal responsable en los problemas derivados de infecciones fágicas. Nes y col. (1988) reportaron un valor de burst size menor para el fago B2 (12-14 UFP/centro de infección) y un período de latencia mayor (75 min) pero este estudio

fue realizado a 30°C. Esta diferencia en los valores de burst size podría explicarse de acuerdo a lo reportado por Guttman y col. (2005). Estos autores sugieren que los parámetros período de latencia y burst size son característicos de cada fago bajo determinadas condiciones particulares, siendo afectados por el huésped empleado, el medio y la temperatura. De manera similar, el fago JL-1 demostró un valor de burst size bajo (22 UFP/centro de infección a 30°C) (Lu y col., 2003a). Sin embargo, para el fago fri fue reportado un valor de burst size elevado a 30°C (200 UFP/centro de infección) y un período de latencia de 75 min, también superior a los obtenidos para nuestros sistemas (Trevors y col., 1983). Los valores de burst size para otras especies de bacterias lácticas fueron variables, evidenciándose valores extremadamente altos en sistemas de *St. thermophilus* (276-370 UFP/centro de infección) (Tremblay y Moineau, 1999; Guglielmotti y col., 2009).

Cuando se llevaron a cabo curvas en un paso para el fago fri sobre *Lb. plantarum* HER 1325, a 30°C y 37°C, se observaron diferencias en el comportamiento. A 30°C, el proceso evolucionó correctamente mientras que a 37°C, no hubo liberación de partículas fágicas luego de 240 min de incubación, aún cuando las suspensiones fueron tratadas con cloroformo para lograr la rotura de la pared celular. Esto indicaría que no se produjo el ensamble de las partículas fágicas dentro de la célula y por ello tampoco es posible la formación de placas de lisis a esta temperatura, como se explicó anteriormente. En contraste, el desarrollo intracelular del fago LP1-A sobre *Lb. plantarum* 14917 no fue afectado por la temperatura aunque sí la producción de placas de lisis (Caso y col., 1995).

El ciclo vegetativo de multiplicación fágica comienza con la adsorción del fago a la pared celular de la bacteria susceptible, el cual es un evento altamente específico (Neve, 1996). La velocidad y eficiencia de la adsorción pueden variar para un determinado sistema fago/huésped dependiendo de factores externos y del estado fisiológico de la cepa hospedadora (Guttman y col., 2005).

Los fagos B1 y B2 se adsorbieron eficientemente en cortos períodos de tiempo sobre su cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014. Sin embargo, para lograr elevadas tasas de adsorción del fago B1 sobre las cepas sensibles *Lb. plantarum* WCSF1 y LM9211 se requirieron tiempos prolongados. Esto podría ser consecuencia de una reducción, con respecto a la cepa hospedadora *Lb. plantarum* ATCC 8014, en el número de sitios receptores disponibles, por modificaciones químicas que imposibilitarían la interacción fago/cepa o por un acceso restringido a los receptores debido a impedimentos estéricos. Un comportamiento similar fue informado para *Lb. paracasei* (Capra y col., 2006b).

Por otro lado, los resultados obtenidos al estudiar la adsorción de los fagos B1 y B2 sobre diversas cepas resistentes a dichos fagos, sugerirían que los mecanismos de fagorresistencia involucrados estarían relacionados al bloqueo en la adsorción o a una etapa posterior, dependiendo del sistema estudiado.

Para las cepas WCSF1 y LMG9211 se evidenció la presencia de mecanismos de fagorresistencia del tipo R/M debido a las variaciones observadas en los valores de EOP. A través del secuenciamiento del genoma, en la base de datos de GenBank, se reportaron sistemas R/M del tipo I para la cepa WCSF1 (EMBL Accession Number AL935263; Kleerebezem y col., 2003). Los mismos resultados se encontraron para la cepa *Lb. plantarum* ST-III (GenBank Accession Number CP002222; Wang y col., 2011), mientras que para la cepa JDM1 (*Lb. plantarum*), se evidenciaron sistemas del tipo III (GenBank Accession Number CP001617; Zhang y col., 2009).

El fago fri, que no produjo placas de lisis a 37°C sobre *Lb. plantarum* HER 1325 y cuyo desarrollo intracelular no evolucionó a dicha temperatura, se adsorbió eficientemente en esas condiciones. Por lo tanto y de acuerdo a los resultados expuestos con anterioridad para este sistema, la interrupción de su ciclo lítico ocurriría luego de la adsorción y antes del ensamble de los viriones (Caso y col., 1995).

Entre los factores que pueden influenciar el proceso de adsorción fágica, podemos mencionar la presencia de cationes divalentes. En este caso, los iones calcio no fueron indispensables para llevar a cabo la adsorción de los fagos de *Lb. plantarum*. El mismo comportamiento fue observado para fagos de otras especies de BAL (Watanabe y Takesue, 1972; Séchaud y col., 1989; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006b; Suárez y col., 2008a; Wang y col., 2010). Sin embargo, el calcio fue necesario para la adsorción del fago temperado Cb1/342 sobre *Lb. delbrueckii* Cb1 (Trucco y col., 2011) y del fago MLC-A sobre *Lb. paracasei* A (Capra y col., 2006a). De acuerdo a lo reportado por Séchaud y col. (1989), la presencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} estabiliza el ADN fágico en el interior de la cápside, incrementa la tasa de adsorción y regula la eficiencia de la penetración del ADN viral al interior de las células bacterianas. Para el fago JL-1 (*Lb. plantarum*) también se demostró la independencia de los iones calcio para llevar a cabo el proceso de adsorción (Lu y col., 2003a).

El pH del medio también puede afectar la adsorción fágica. En este caso los cuatro fagos adsorbieron eficientemente sobre células de *Lb. plantarum* ATCC 8014 en el rango de pH de 5 a 8, aunque las condiciones óptimas estuvieron comprendidas entre valores de pH desde 5 a 7. Al igual que para los fagos de *Lb. plantarum*, la máxima adsorción de fagos de

otras bacterias lácticas se produjo en valores cercanos al pH de la leche (Watanabe y Takesue, 1972; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006a, 2006b; Müller-Merbach y col., 2007; Suárez y col., 2008a; Trucco y col., 2011). Para los fagos de *Lb. plantarum*, las tasas de adsorción disminuyeron a valores de pH superiores a 8. Sin embargo, la viabilidad de los fagos y de la cepa en estas condiciones no fue afectada. Por lo tanto, los pH básicos afectarían el proceso de adsorción en sí, probablemente a través de modificaciones a nivel de la superficie celular que dificultarían la interacción cepa/fago. Lamentablemente, en la industria láctea no se trabaja en estas condiciones de pH, por lo que la adsorción fágica estaría favorecida desde este punto de vista aunque, debido a la pérdida de viabilidad fágica a pH ácidos, podría disminuir cuando el mismo cae por debajo de 5.

La adsorción fágica sólo fue afectada a temperaturas de 50°C, aunque las máximas tasas de adsorción se lograron entre 30°C y 42°C. En general, la adsorción de fagos de bacterias lácticas fue máxima a la temperatura óptima de desarrollo de cada especie. Para algunos sistemas la adsorción disminuyó a temperaturas inferiores a 30°C mientras que para otros sistemas, el proceso de adsorción fue independiente de la temperatura de incubación (Watanabe y Takesue, 1972; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006a, 2006b; Müller-Merbach y col., 2007; Suárez y col., 2008a; Trucco y col., 2011). Watanabe y col. (1993) demostraron que, si bien la disminución inicial en el número de partículas fágicas libres (adsorción reversible) no fue afectada por una reducción en la temperatura de reacción, la formación de complejos irreversibles célula/fago fue inhibida a bajas temperaturas. Los fagos LP1-A, LP1-B, LP2 y fri de *Lb. plantarum* mostraron iguales tasas de adsorción a 30°C y 37°C aunque la propagación fágica a estas dos temperaturas fue diferente, dependiendo del sistema estudiado (Caso y col., 1995).

El estado fisiológico celular puede cambiar la concentración de moléculas de la superficie celular y así la eficiencia de la infección fágica (Kutter y Goldman, 2008). En esta Tesis, la tasa de adsorción fágica sobre células de *Lb. plantarum* ATCC 8014 tratadas térmicamente (no viables) fue más baja en comparación con los valores obtenidos sobre células viables. Un comportamiento similar fue reportado para fagos de *Lb. casei* (Capra y col., 2006a, 2006b), *L. lactis* (Suárez y col., 2008a) y *Lb. delbrueckii* (Trucco y col., 2011). Sin embargo, para otras especies de BAL, el estado fisiológico celular no tuvo influencia en la adsorción fágica (Watanabe y col., 1993; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Stiefel, 2000; Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004). La disminución en los valores de adsorción obtenidos sobre células tratadas térmicamente podría estar relacionada a la desorganización de los

receptores fágicos provocada por elevadas temperaturas y/o al estado fisiológico celular en sí mismo. Teniendo en cuenta estas hipótesis, se estudió la influencia de agentes inhibidores de la síntesis proteica sobre la adsorción fágica. Inmediatamente después del tratamiento con antibióticos (cloranfenicol), las células de *Lb. plantarum* ATCC 8014, no proliferantes pero que aún mantenían el contenido original de ATP (Hahn y col., 1955; Watanabe y col., 1991), fueron capaces de adsorber partículas fágicas. Por lo tanto, la reducción en la tasa de adsorción al trabajar con células tratadas térmicamente se debe a la naturaleza termosensible del receptor fágico y no a la disminución del contenido energético celular. Si bien no se esperaría que la unión de fagos a la superficie celular sea un proceso dependiente de la energía, varios autores estudiaron este punto obteniendo resultados diferentes. La adsorción del fago fd (*E. coli*) no fue un proceso dependiente de la energía cuando se estudiaron diversos agentes inhibidores (Yamamoto y col., 1980). Por otro lado, el fago PL-1 se adsorbió sobre células de *Lb. casei* que habían sido destruídas por exposición a la luz UV (Watanabe y col., 1993). Sin embargo, la adsorción del fago PRD1 a *Salmonella typhimurium* DS88 fue drásticamente disminuida cuando se utilizaron compuestos inhibidores (NaN_3 , NaF y arsenato) que disminuyeron la concentración intracelular de ATP (Daugelavicius y col., 1997).

Como se mencionó anteriormente, la adsorción es un evento altamente específico y depende de la presencia de sitios de unión específicos sobre la pared celular bacteriana, denominados receptores. Para que se produzca una correcta unión fago/receptor, es indispensable que la estructura de los receptores fágicos se mantenga íntegra y que conserve una determinada conformación espacial (Neve, 1996).

Los estudios sobre receptores fágicos se pueden realizar sobre células enteras o paredes celulares purificadas. Estos estudios involucran tratamientos químicos y enzimáticos que podrían afectar o destruir, de una manera selectiva, componentes de la superficie celular. Cuando se utilizan células bacterianas enteras puede ocurrir una posterior liberación de sustancias intracelulares que podrían contaminar o interferir con los experimentos de adsorción fágica. Por esta razón, se utilizaron paredes celulares purificadas para llevar a cabo estudios de receptores fágicos en *Lb. plantarum* ATCC 8014.

Un procedimiento simple para lograr la ruptura de las células bacterianas es la agitación de suspensiones celulares mediante un vortex, en presencia de perlas de vidrio (Quiberoni y col., 2000). Esta metodología fue utilizada en la presente Tesis para obtener paredes celulares de *Lb. plantarum* ATCC 8014. La efectividad del proceso de disrupción se monitoreó mediante observación en microscopio óptico y recuentos celulares.

Con el objetivo de identificar los componentes de la pared celular involucrados en la adsorción fágica, se realizaron ensayos de adsorción utilizando paredes celulares purificadas tratadas química y enzimáticamente. La aplicación de estos tratamientos demostró que los receptores fágicos de *Lb. plantarum* contienen carbohidratos en su composición. Los mismos resultados fueron obtenidos para otras especies de bacterias lácticas (Quiberoni y col., 2000; Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2009). Por su parte, Valyasevi y col. (1991) y Arendt y col. (1993) reportaron receptores fágicos de origen proteico en *L. lactis* subsp. *lactis*. Además, las proteínas de la capa S-layer de ciertas cepas de *Lb. helveticus* fueron esenciales para la adsorción del fago CNRZ-B1 (Ventura y col., 1999).

Douglas y Wolin (1971) utilizaron mutantes fagorresistentes para identificar la naturaleza de los receptores fágicos de las cepas *Lb. plantarum* ATCC 8014 y ATCC 10241. Los polisacáridos de la pared celular de la cepa ATCC 8014, y específicamente la galactosa, fueron esenciales para la infección del fago B1. Sin embargo, la adsorción del fago B2 sobre *Lb. plantarum* ATCC 1024 estuvo determinada por los ácidos teicoicos y, más específicamente, por los sustituyentes de glucosa.

Varios monosacáridos pueden ser testeados en experimentos de inactivación fágica con el objetivo de identificar los azúcares específicos que formarían parte de los receptores fágicos. Yokokura (1977) reportó que los efectos de inactivación fágica por parte de monosacáridos fueron dependientes de la temperatura y de la concentración de cada sustancia (concentraciones menores a 200 mM no produjeron inhibición en *Lb. casei*). La inhibición por monosacáridos fue claramente demostrada para fagos de *St. thermophilus* (Quiberoni y col., 2000; Binetti y col., 2002). Para esta especie bacteriana, el fago CYM fue inactivado por glucosamina y ramnosa mientras que la glucosamina y ribosa interfirieron la adsorción del fago OBJ (Quiberoni y col., 2000). Binetti y col. (2002) reportaron un efecto inhibitor en presencia de ramnosa y ribosa para el fago 021-4. Los fagos 021-5, 031 y 031-D, todos infectivos de la cepa *St. thermophilus* ST 12-5, fueron igualmente inhibidos por glucosamina y N-acetilglucosamina indicando que todos los fagos reconocerían el mismo receptor (Binetti y col., 2002). Para *Lb. casei*, la D-galactosamina inactivó completamente al fago J-1, incrementando la inactivación fágica en presencia de L-ramnosa (Yokokura, 1977). Sin embargo, para los fagos de *Lb. plantarum* estudiados en esta Tesis así como también para otros sistemas de *Lb. casei* (Capra y col., 2009), *Lb. helveticus* (Quiberoni y Reinheimer, 1998) y *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2004) no se observaron efectos de inhibición por parte de monosacáridos o bien los resultados obtenidos fueron muy variables. Para explicar este fenómeno pueden postularse varias hipótesis: los monosacáridos usados en los

experimentos de inhibición no estarían involucrados en la adsorción fágica, una combinación de monosacáridos podría actuar como receptores fágicos y/o la conformación de los monosacáridos en las paredes celulares es diferente a la de los monosacáridos usados en los experimentos. En consecuencia, como no fue posible obtener resultados concluyentes para los fagos de *Lb. plantarum* con los experimentos de inactivación fágica con monosacáridos, se llevaron a cabo ensayos complementarios de competencia y desorción. Sin embargo, con estos estudios tampoco fue posible obtener conclusiones en cuanto a los azúcares constituyentes de los receptores fágicos.

Las lectinas son un grupo variado de proteínas que reconocen y se unen de una manera altamente específica a carbohidratos. Por lo tanto, ellas podrían unirse a los monosacáridos ubicados en la superficie celular bloqueando de esta manera la adsorción fágica, siempre y cuando los azúcares reconocidos por las lectinas sean semejantes a los que componen los receptores fágicos (Valyasevi y col., 1994; Hernández Cruz y col., 2005). En consecuencia, si los receptores fágicos tienen naturaleza hidrocabonada, las lectinas cuyos azúcares de unión son conocidos podrían ser utilizadas para identificar de manera selectiva los carbohidratos presentes en la superficie celular (Ishibashi y col., 1982). Desafortunadamente, la disponibilidad comercial de lectinas es escasa ya que, en general, las mismas son aisladas y purificadas en los mismos laboratorios donde se llevarán a cabo los estudios correspondientes. No fue posible obtener resultados concluyentes para identificar receptores fágicos en *Lb. plantarum* ATCC 8014 al ensayar diversas lectinas. Para *Lb. casei* (Ishibashi y col., 1982) se reportaron tasas de adsorción del fago PL-1 sobre *Lb. casei* ATCC 27092 disminuidas en presencia de ConA (60%) con respecto a los valores obtenidos por el control (92%), mientras que en presencia de las lectinas de *Arachis hypogaea* y *Wisteria floribunda* no hubo diferencias en los valores de adsorción fágica.

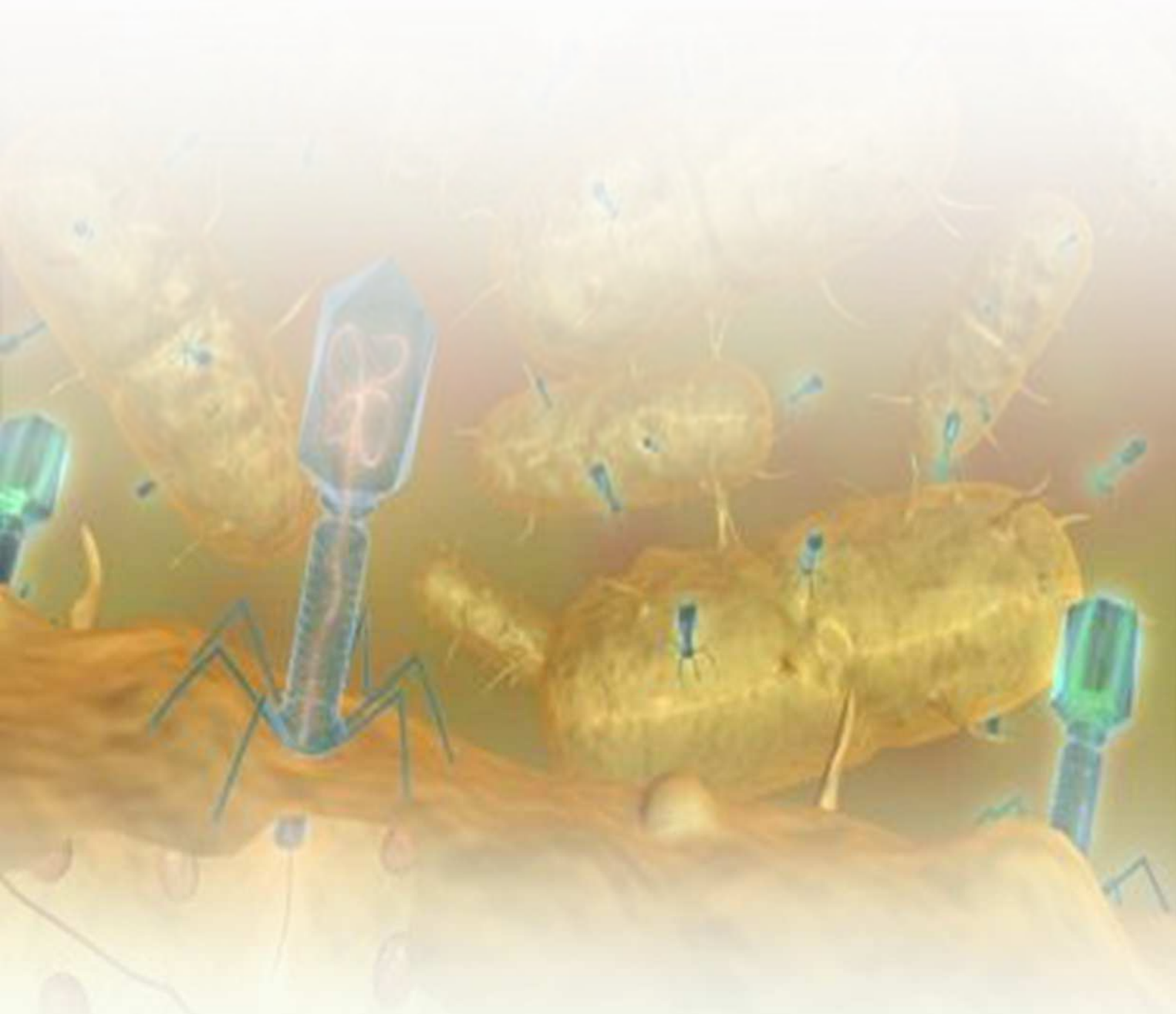
Como se mencionó anteriormente, el ciclo lítico comienza con la adsorción de un fago a la superficie de una bacteria sensible. Normalmente, este proceso consta de dos etapas, la primera, reversible, y la segunda irreversible. Para los fagos de *Lb. plantarum* no se observó una tendencia hacia la desorción espontánea, lo cual revela irreversibilidad en la adsorción. Los mismos resultados fueron reportados para *L. lactis* subsp. *cremoris* (Valyasevi y col., 1990), *St. thermophilus* (Quiberoni y col., 2000; Binetti y col., 2002), *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2004) y *Lb. casei* (Capra y col., 2009). En contraste, la adsorción sobre las paredes celulares de *L. lactis* subsp. *lactis* fue un proceso reversible el cual no fue afectado por la temperatura cuando se trabajó en un rango de 4°C a 30°C (Monteville y col., 1994).

Capítulo II

Estrategias para enfrentar infecciones fágicas



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Problemática de las infecciones fágicas en la industria láctea

Como se mencionó anteriormente, las infecciones fágicas constituyen un problema constante en la industria láctea fermentativa (Brüssow y Kutter, 2005). Este problema se agravó debido al aumento en el volumen de leche procesada en las plantas lácteas, lo que ocasiona una presión considerable sobre los sistemas de manipulación de cultivos iniciadores y dificulta la correcta limpieza de la planta (Heap y Harnett, 2003).

Las consideraciones económicas relacionadas a las infecciones fágicas incentivaron el desarrollo de medidas adecuadas para disminuir su incidencia en los ambientes industriales. En primer lugar, se debe conocer la extensión del problema, identificar la ecología de fagos en los ambientes industriales, evaluar su concentración y distribución en tiempo y espacio (Brüssow y Kutter, 2005). Una vez identificado y caracterizado el problema, se deben diseñar y seleccionar las estrategias de control que permitan obtener productos fermentados de buena calidad (Heap y Harnett, 2003). Las estrategias aplicadas dependerán de cada industria en particular, de su volumen de producción y de la variedad de productos elaborados (Moineau y Lévesque, 2005).

Sin embargo, a pesar de las mejoras continuas en estos aspectos, las infecciones fágicas continúan siendo un problema significativo para la industria láctea fermentativa (Heap y Harnett, 2003). Debido a la presencia constante de fagos en los ambientes industriales, las estrategias implementadas, tanto en los ambientes de elaboración como en los laboratorios, tienden a lograr su control y no su erradicación (Moineau y Lévesque, 2005). Como consecuencia de que los fagos no pueden ser eliminados completamente de los ambientes industriales, se aconseja realizar, de manera periódica, determinaciones de la carga fágica en las diversas áreas a fines de conocer cuan efectivas son las medidas implementadas (Rodríguez González y col., 2010).

Para determinar la concentración de fagos en los ambientes se pueden aplicar diversas técnicas. La elección de la metodología a utilizar dependerá de la sensibilidad buscada y del equipamiento del que disponga el laboratorio (Moineau y Lévesque, 2005; Garneau y Moineau, 2011). Una de ellas se basa en la observación de placas de lisis en medio agarizado, usando una cepa pura como hospedadora. Para favorecer la visualización de las placas de lisis, se pueden agregar cationes divalentes, glicina o modificar la temperatura de incubación. Por otro lado, también se puede realizar un test de actividad de la cepa en leche en presencia o

ausencia de la muestra sospechosa de contener fagos. En este caso, se observa la variación de pH y se comparan los valores obtenidos en ambas situaciones (Moineau y Lévesque, 2005). Los ensayos descritos permiten detectar partículas fágicas activas y diferenciar la inhibición causada por fagos de aquella provocada por otros agentes inhibidores como antibióticos. Sin embargo, estos estudios requieren de tiempos relativamente prolongados (Quiberoni y col., 2011). Por ello, una alternativa es el uso de herramientas moleculares, las cuales permiten obtener resultados en cortos períodos de tiempo. Los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) son útiles en la detección de fagos en leche, suero de quesería y fermentos naturales. Otras metodologías aún más rápidas y sensibles son el uso de PCR basada en fluorescencia y de PCR en tiempo real (qPCR) (Garneau y Moineau, 2011). La qPCR fue recientemente utilizada en ensayos para la detección de fagos de *Lb. delbrueckii* y *St. thermophilus* en muestras lácteas, obteniendo amplificaciones dentro de los 30 min. Sin embargo, como estas técnicas detectan ADN fágico, no discriminan entre partículas fágicas activas y no activas (Quiberoni y col., 2011).

2. Estrategias para disminuir la incidencia de infecciones fágicas

2.1. Diseño de la planta

A fin de minimizar los incidentes debidos a infecciones fágicas, las diversas áreas (recepción de la leche, preparación del fermento, producción y procesamiento de suero) de la planta, deberían estar físicamente separadas. En particular se aconseja que los tanques conteniendo suero estén ubicados lo más lejos posible de las áreas de preparación de fermento y producción, y estén sometidos a presión negativa de aire (Rodríguez González y col., 2010). De esta manera, el diseño de la planta apuntaría a evitar el contacto entre materia prima y desechos (suero o agua) (Heap y Harnett, 2003; Moineau y Lévesque, 2005).

En particular, el área de recepción de la materia prima resulta riesgosa debido a que los fagos presentes en la leche, así como también las partículas fágicas contenidas en los bioaerosoles generados durante el vaciamiento y lavado de los tanques, podrían dispersarse por toda la planta (Heap y Harnett, 2003).

Por otro lado, para controlar las infecciones fágicas, uno de los aspectos a tener en cuenta es que los cultivos iniciadores no estén contaminados con partículas fágicas (Lyne, 2011). Para ello, la preparación del fermento debe hacerse asépticamente y el acceso a la sala de preparación debería contar con un sistema de intercambio de ropa y calzado para el personal (Heap y Harnett, 2003; Moineau y Lévesque, 2005). La leche empleada en la preparación puede ser sometida al tratamiento térmico (95°C, 30 min) en el mismo tanque

donde se va a propagar el cultivo o bien puede ser utilizado un sistema de pasteurización de alta temperatura, corto período de tiempo (HTST, High Temperature Short Time) (95°C, 60 seg). En el primer caso, se utiliza vapor para eliminar las partículas fágicas que pudieran estar presentes en el espacio de cabeza del tanque. En ambos casos, para evitar que la leche se contamine con fagos una vez enfriada, se utiliza aire estéril para mantener la sobrepresión en los tanques donde se propagará el fermento. Luego, una vez que el cultivo iniciador fue propagado, es incorporado al tanque a través de un sistema de inoculación aséptico (Lyne, 2011). Sin embargo, para disminuir los problemas derivados de la multiplicación fágica durante las etapas de propagación del fermento, resulta conveniente el uso de cultivos de inoculación directa (Rodríguez González y col., 2010).

El acceso al área de producción debería disponer de un sistema de lavado desinfectante de manos y pies así como también de equipos de secado. Los desagües deberían ser limpiados periódicamente con sanitizantes (Heap y Harnett, 2003; Moineau y Lévesque, 2005).

2.2. Equipamiento de la planta

Los equipos utilizados deberían ser construidos en acero inoxidable con pulido de alto grado y ser sometidos a una eficiente limpieza y sanitización antes de su uso. En particular, los tanques de fermentación deben ser cerrados, esterilizados usando calor o sanitizantes, con presión positiva de aire filtrado en el espacio de cabeza e inspeccionados periódicamente por roturas (Heap y Harnett., 2003).

2.3. Higiene de la planta

Los fagos pueden diseminarse por la planta a través de diversas fuentes, entre las cuales la más importante es el aire (Garneau y Moineau, 2011). Las partículas fágicas han sido detectadas en una concentración de 10^5 UFP/ml en el aire de ambientes industriales lácteos (Heap y Harnett., 2003; Moineau y Lévesque, 2005). Por lo tanto, se debe limitar la producción de bioaerosoles así como también disminuir su carga microbiana mediante el uso de sistemas spray con adecuados desinfectantes (Moineau y Lévesque, 2005). Otra estrategia para evitar este problema involucra el empleo de flujos de aire de presión positiva desde la sala donde se prepara el fermento hasta donde se realiza el envasado del producto, para disminuir la carga microbiana en cada una de las áreas. Adicionalmente, el aire debe ser filtrado para retener partículas de polvo, a las cuales podrían estar asociados los fagos. La entrada de aire a estos filtros debería estar alejada de los silos de leche y suero, para que su

carga microbiana inicial no sea tan elevada. Por otro lado, la eficiencia de los filtros se debe controlar periódicamente (Heap y Harnett, 2003; Moineau y Lévesque, 2005).



Figura 36. Equipos que emplean radiación ultravioleta, disponibles en el mercado.

Otra estrategia para controlar la diseminación de fagos a través del aire es la aplicación de radiación ultravioleta. Algunos estudios demostraron que esta metodología resultó efectiva en la inactivación de bacterias y virus (Simonet y Gantzer, 2006; Altic y col., 2007). En el mercado, están disponibles ciertos equipos que utilizan radiación ultravioleta de onda corta o germicida (UV-C: 200 - 280 nm) (www.morphairstore.com; www.koveritalia.com; www.lamparas-ultravioleta.com) (Figura 36). Estos equipos resultan efectivos en la eliminación de microorganismos en diversos ambientes

(industrias, hospitales). Sin embargo, no pueden utilizarse en presencia de personas debido a los daños provocados por la radiación UV-C sobre la salud humana.

Para incrementar la eficiencia de inactivación, se puede anexar un catalizador. En este caso, la tecnología recibe el nombre de fotocatalisis y emplea, en general, longitudes de onda superiores (UV-A: 320 - 400 nm), lo que permite que pueda ser aplicada en presencia de personas. Entre los catalizadores, el TiO_2 es el más comúnmente utilizado debido a su bajo costo, a su abundancia natural y a que no presenta propiedades tóxicas (Fujishima y col., 2000).

El proceso de fotocatalisis se basa en la generación de especies altamente oxidantes, como los radicales $\cdot\text{OH}$ generados, como consecuencia de la absorción de radiación UV por parte del semiconductor (TiO_2). Esta metodología es considerada como una alternativa tecnológica interesante para la eliminación de contaminantes presentes tanto en agua como en aire (Zacarías y col., 2010). En particular, es comúnmente utilizada en la destrucción de hongos, bacterias y esporos (Kühn y col., 2003; Pal y col., 2005; Pal y col., 2007; Zacarías y col., 2010). Sin embargo, las investigaciones referidas a la eficiencia de esta metodología en la inactivación de partículas fágicas apuntan principalmente a fagos específicos de *E. coli* (Sjogren y Sierka., 1994; Koziumi y Taya, 2002; Cho y col., 2005), siendo escasa la información referida a fagos de bacterias lácticas (Kakita y col., 2000; Kashige y col., 2001). Teniendo en cuenta ésto, resultaría interesante evaluar el comportamiento de fagos de

bacterias lácticas frente a tratamientos fotocatalíticos que podrían aplicarse, en combinación con otras estrategias, para disminuir la carga microbiana en los ambientes industriales.

Adicionalmente, un régimen adecuado de limpieza y desinfección de equipos y utensilios usados durante la elaboración es fundamental para el mantenimiento de niveles bajos de bacteriofagos. El ácido peracético (0,15%) ha demostrado ser el biocida más efectivo, produciendo inactivación de las partículas fágicas rápidamente. Por otro lado, el hipoclorito de sodio demostró asimismo una alta efectividad sobre gran variedad de fagos. Sin embargo, el etanol y el isopropanol usados clásicamente para la limpieza de superficies y utensilios de laboratorio, son menos efectivos en la inactivación de las partículas virales (Sturino y Klaenhammer, 2004; Garneau y Moineau, 2011).

Los equipos deben ser limpiados y desinfectados cuando finaliza un proceso de producción. De esta manera se eliminan los biofilms que pudieran haberse formado sobre su superficie. Un aspecto a tener en cuenta es que no debería usarse el mismo equipo (por ejemplo centrifugas) para el procesamiento de la materia prima y del suero a fines de evitar la contaminación cruzada (Moineau y Lévesque, 2005).

En las industrias, existe un programa de limpieza “in situ” (Clean in Place, CIP), que emplea diversas soluciones, y es utilizado para mantener la higiene de los equipos y tuberías (Figura 37). Sin embargo, los sistemas de cañerías y los equipos deberían incluirse en un circuito CIP separado de los utilizados para la línea de almacenamiento y circulación de cultivos. Adicionalmente, las válvulas de los equipos deben ser fáciles de desarmar y limpiar. De igual manera, los drenajes del piso deben desinfectarse en las diversas áreas de la planta (Heap y Harnett, 2003; Moineau y Lévesque, 2005).

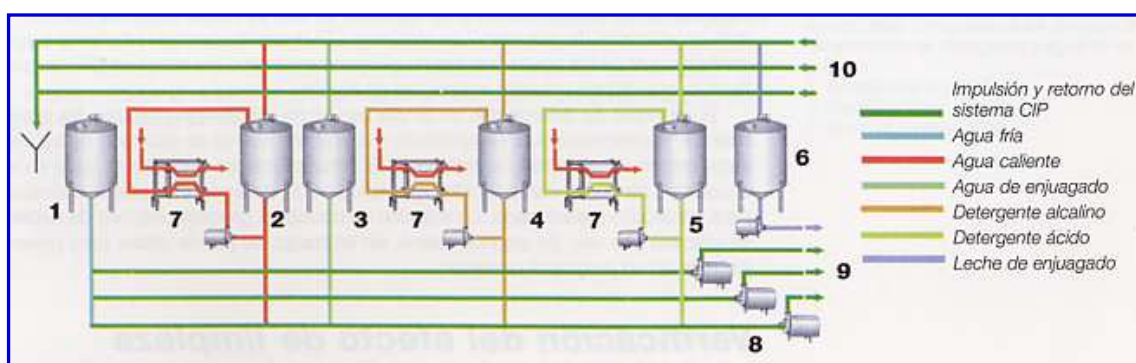


Figura 37. Diseño general de una estación CIP de limpieza.

1: Tanque de agua fría; **2:** Tanque de agua caliente; **3:** Tanque de agua de enjuagado; **4:** Tanque de detergente alcalino; **5:** Tanque de detergente ácido; **6:** Tanque de leche de enjuagado; **7:** Intercambiador de calor de placas de calentamiento; **8:** Bombas de impulsión del sistema CIP; **9:** Líneas de impulsión del sistema CIP; **10:** Línea de retornos del sistema CIP.

Las soluciones utilizadas en los sistemas de limpieza CIP poseen valores extremos de pH y teniendo en cuenta que los fagos son sensibles a estas condiciones, se eliminaría la posibilidad de distribución de fagos a través de este sistema de limpieza. Sin embargo, si los pasos recomendados durante el proceso no se cumplen, los fagos podrían distribuirse entre los equipos (Atamer y col., 2011).

El suero de quesería debe ser removido en tuberías cerradas y sometido a una termización o pasteurización para eliminar las células bacterianas y así evitar la propagación de los fagos. De igual manera, cuando se emplean cultivos que requieren etapas previas de propagación, los excedentes de cultivos deberían ser sometidos a un tratamiento, y no ser eliminados directamente al efluente ya que contienen una elevada carga microbiana, sustrato para la proliferación fágica (Heap y Harnett, 2003).

Adicionalmente, el suministro de agua utilizado para dilución de los ingredientes agregados en tina como el cuajo, debe ser monitoreado en cuanto a su carga viral (Heap y Harnett, 2003).

2.4. Tratamiento de la leche

La leche cruda es la principal fuente de fagos que ingresan a las plantas lácteas. En general, las partículas fágicas se encuentran en una concentración comprendida entre 10^1 y 10^4 UFP/ml (Moineau y Lévesque, 2005). Por ello es importante que cuando la leche es recibida en la planta, sea rápidamente almacenada en refrigeración para disminuir las posibilidades de propagación fágica. Antes de su uso, la leche debe ser sometida a un tratamiento térmico que, dependiendo del tipo de producto a elaborar, se aplica a fin de disminuir la carga microbiana (patógenos y alterantes). Estos tratamientos térmicos, indirectamente, disminuyen además la carga viral (Heap y Harnett, 2003).

Sin embargo, la mayoría de los bacteriofagos resisten el tratamiento de pasteurización e, incluso, algunos evidenciaron una elevada resistencia térmica tolerando tratamientos a 95°C durante 5 min. Esta termorresistencia se vio incrementada en presencia de leche o suero lo cual puede deberse a que las proteínas de la leche ejercen un efecto protector de las partículas fágicas. Es por ello que aún cuando se realice un tratamiento térmico sobre la materia prima, una determinada carga viral resistirá a dicho tratamiento (Sturino y Klaenhammer, 2004; Atamer y col., 2009; Atamer y col., 2010; Atamer y col., 2011).

Por otro lado, se han encontrado altos niveles de fagos (10^9 UFP/ml) con elevada resistencia térmica en suero de quesería y mantequería, salmuera y crema. Esto puede resultar problemático si el suero de quesería o de mantequería es incorporado a la materia prima para

aumentar el rendimiento en la industria quesera, debido a la recontaminación. Para disminuir los problemas asociados a esto, se recomienda realizar un tratamiento térmico del suero antes de su reciclado (Atamer y Hinrichs 2010; Atamer y col., 2011; Garneau y Moineau, 2011).

Como consecuencia de que, en general, los tratamientos térmicos aplicados a la leche y al suero no son completamente eficaces en la inactivación fágica, los fagos resistentes pueden diseminarse por toda la planta a través de bioaerosoles (Sturino y Klaenhammer, 2004). Por lo tanto, es esencial aplicar una serie de medidas que, implementadas en conjunto, puedan conducir a un control más efectivo de los fagos.

2.5. Medios inhibidores de fagos

Se han diseñado medios de cultivo conteniendo diversos componentes que, con eficiencia variable, están destinados a lograr la inhibición o retardo de la propagación fágica (Garneau y Moineau, 2011).

Por ejemplo, teniendo en cuenta que algunos fagos requieren calcio para su multiplicación, una estrategia disponible es el uso de PIM durante la propagación del fermento. Estos medios de cultivo, además de nutrientes (sólidos lácteos, extracto de levadura y peptonas) están constituidos por agentes quelantes como fosfatos o citratos, capaces de ligar cationes divalentes, en particular calcio. De esta manera, el calcio sería ligado por los agentes quelantes y no quedaría disponible para los fagos durante su ciclo de multiplicación (Sturino y Klaenhammer, 2004).

Sin embargo, los fagos que no puedan multiplicarse durante la etapa de propagación del fermento debido a los PIM, sí podrían hacerlo en tina en donde el proceso de fermentación será llevado a cabo usando leche como sustrato (Heap y Harnett, 2003).

Si bien en determinadas situaciones estos medios fueron utilizados con éxito, en la mayoría de los casos y como consecuencia de la evolución fágica, las partículas virales no requieren calcio para su propagación. Por lo tanto, esta estrategia puede aplicarse con éxito en ciertos casos puntuales. Además, se ha observado que la presencia de sales de fosfatos puede inhibir el desarrollo de algunas cepas de *Lactococcus* (Lyne, 2011).

2.6. Selección de cepas

Como se mencionó anteriormente, los fermentos naturales (de suero o de leche) presentan mayor resistencia fágica en comparación a los fermentos seleccionados comerciales, debido a su elevada complejidad microbiana y a la constante presión de selección que genera mayor autoprotección frente a fagos líticos. Sin embargo, el uso de

fermentos seleccionados lleva a la obtención de productos con calidad constante, por lo que su uso está muy difundido a nivel industrial. Estos fermentos pueden estar compuestos por una (monocepa) o varias cepas (multicepa) (Carminati y col., 2010). Cuando el fermento está compuesto por una única cepa, la aparición de un fago lítico conducirá a la inhibición de su capacidad acidificante. Por esta razón, se recomienda el uso de fermentos multicepa, ya que si una de las cepas es infectada, las demás pueden continuar con su actividad tecnológica. Entre los fermentos comerciales, se recomienda el uso de fermentos de inoculación directa (Direct Vat Inoculation, DVI) para evitar etapas de propagación del cultivo que podrían favorecer las infecciones fágicas (Moineau y Lévesque, 2005).

Otra estrategia disponible para disminuir la frecuencia de infecciones fágica es la implementación de programas de rotación de cultivos (Garneau y Moineau, 2011). En este caso, es importante conocer el rango de hospedadores de las cepas que formarán parte del sistema de rotación, para elegir aquéllas que presenten patrones de sensibilidad fágica diferentes (Moineau y Lévesque, 2005; Rodríguez González y col., 2010). Adicionalmente y como se mencionó anteriormente, las cepas utilizadas no deberían ser hospedadoras de fagos que pudieran liberarse espontáneamente (lisógenas) (Heap y Harnett, 2003; Moineau y Lévesque, 2005). En general, se seleccionan grupos de 2 a 4 cepas con propiedades tecnológicas adecuadas y con sensibilidad a diferentes tipos de fagos, y se las utiliza durante 4 o 5 días seguidos. Transcurrido este tiempo, se reemplazan por otro grupo de cepas, de tal manera de mantener la concentración de fagos en el ambiente por debajo de los niveles críticos y así llevar a cabo una elaboración satisfactoria. Sin embargo, no resulta tan sencillo contar con cepas que posean características tecnológicas adecuadas y que no estén relacionadas en cuanto a su sensibilidad fágica. Por otro lado, el uso de gran cantidad de cepas genéticamente distintas puede favorecer la aparición de una población fágica más heterogénea, pudiendo aumentar el número de mutaciones o de recombinaciones genéticas dentro del pool de fagos de la planta (Moineau, 1999; Moineau y Lévesque, 2005).

Esta estrategia de rotación de cultivos no se podría aplicar para cepas probióticas ya que las propiedades fueron demostradas científicamente para una cepa en particular, resultando muy difícil reemplazarla por otra cepa de similares características.

Adicionalmente, se puede realizar la rotación de tecnologías, por ejemplo intercalar producciones que involucren el uso de cepas mesófilas con aquellas de cepas termófilas (Moineau y Lévesque, 2005). Sin embargo, es imperativo resaltar que no es conveniente combinar tecnologías que utilicen fermentos seleccionados con aquellas que empleen fermentos naturales, debido a que ésto incrementaría los riesgos de sufrir infecciones por

parte de los fagos (virulentos y temperados) normalmente presentes en estos cultivos naturales (Suárez y col., 2002; Reinheimer, 2005).

2.7. Obtención de cepas con resistencia fágica mejorada

2.7.1. Mutantes espontáneos fagorresistentes

Cuando una cepa muestra sensibilidad a fagos, puede ser reemplazada usando mutantes fagorresistentes de la cepa original. Sin embargo, para resultar útil a nivel industrial, la cepa mutante debería mantener los mismos atributos tecnológicos que la cepa sensible (Lyne, 2011).

Los mutantes espontáneos fagorresistentes se obtienen luego de la exposición prolongada de una determinada cepa fago sensible a fagos líticos. Como consecuencia de ello sobrevivirá sólo una pequeña fracción de la población celular, la cual resultará resistente a dicho fago. En general, esta resistencia deriva de una interferencia en la adsorción, debida posiblemente a una mutación espontánea en los genes que codifican para la formación de los receptores fágicos ubicados en la superficie de las células sensibles (Moineau y Lévesque, 2005).

El potencial de los mecanismos de fagorresistencia presentes en los mutantes debe ser sometido a una cuidadosa evaluación, ya que no todos los mecanismos serán capaces de frenar los ataques fágicos a escala industrial. Una de las herramientas para evaluar el nivel de fagorresistencia es la determinación de la eficiencia de plaqueo (EOP = cociente entre el título fágico obtenido sobre el mutante fagorresistente y el título fágico obtenido sobre la cepa madre fago sensible). Los mutantes con elevada fagorresistencia evidenciarán valores de EOP comprendidos entre 10^{-9} y 10^{-7} mientras que una fagorresistencia moderada corresponderá a valores entre 10^{-6} y 10^{-4} . Los sistemas con fagorresistencia débil se relacionan con valores de EOP entre 10^{-3} y 10^{-1} . Sólo los mutantes que presentan moderada y elevada fagorresistencia se pueden utilizar a nivel industrial debido a que los mutantes con fagorresistencia débil no serían seguros para frenar las infecciones fágicas. Otra manera de evaluar la fagorresistencia es a través de la actividad de los mutantes en leche. Una cepa con resistencia fágica mejorada podrá desarrollar en leche y otorgar una adecuada curva de acidificación aún en presencia de una concentración inicial de fagos de 10^6 UFP/ml. Se debe considerar, además, que los mecanismos de fagorresistencia pueden estar influenciados por la temperatura, y algunos de ellos son menos efectivos a altas temperaturas ($> 37^{\circ}\text{C}$). Es por esto que el tipo de proceso fermentativo que se lleve a cabo también debe ser tenido en cuenta cuando se estudia la

eficacia global de un determinado mecanismo de fagorresistencia (Moineau y Lévesque, 2005).

Esta estrategia es simple y no posee restricciones reglamentarias para su uso industrial debido a que las variantes aisladas son derivados espontáneos de las cepas fago sensibles y no están involucradas herramientas genéticas en su obtención (Reinheimer, 2005). Sin embargo, existen ciertas desventajas como una elevada reversión del fenotipo fagorresistencia, resistencia limitada a fagos relacionados, reducción de la velocidad de crecimiento, menor capacidad acidificante y/o proteolítica (Sturino y Klaenhammer, 2004; Moineau y Lévesque, 2005). De manera adicional, en algunos casos, los mutantes pueden ser atacados por fagos diferentes a los utilizados durante su aislamiento e incluso estos fagos pueden ser más infectivos (Lyne, 2011). Aun así, esta metodología resultó útil para el aislamiento de variantes de diversas especies de BAL, cuyas aptitudes tecnológicas fueron excelentes y, en algunos casos, se utilizaron exitosamente en condiciones industriales (Quiberoni y col., 1998a; Reinheimer, 2005).

2.7.2. Transconjugantes

Una gran variedad de mecanismos de defensa naturales de las bacterias frente a los ataques fágicos, se encuentran codificados en plásmidos conjugativos, o sea capaces de mediar su propia transferencia (Reinheimer, 2005). La conjugación puede ser utilizada para transferir genes que codifiquen mecanismos de fagorresistencia a cepas con buenas características tecnológicas (Moineau y Lévesque, 2005; Rodríguez González y col., 2010). Además, esta herramienta puede utilizarse para combinar mecanismos complementarios de defensa fágica en una única cepa (Reinheimer, 2005).

Estos mecanismos naturales de fagorresistencia han sido efectivos contra varios grupos de fagos (Moineau y Lévesque, 2005). En particular, ha sido aplicado con éxito en sistemas de *Lactococcus* debido a la gran disponibilidad de mecanismos naturales de fagorresistencia codificados en plásmidos en esta especie bacteriana. Para *St. thermophilus*, la situación es diferente debido a que pocas cepas contienen plásmidos que codifican para mecanismos de fagorresistencia (Brüssow y Kutter, 2005).

Sin embargo, esta metodología presenta algunos inconvenientes debido a que ciertas cepas son refractarias a la adquisición de ADN foráneo. Además, puede existir incompatibilidad de plásmidos con lo que la introducción de nuevos plásmidos puede generar pérdida de otros ya existentes, que codifiquen para propiedades fundamentales como actividad acidificante y proteolítica. Por otro lado, se debe controlar la estabilidad de los

nuevos plásmidos, ya que es posible que se pierdan con el uso continuado de la cepa (Reinheimer, 2005).

2.7.3. Cepas modificadas genéticamente

Se ha desarrollado una extensa variedad de mecanismos de fagorresistencia mediante el uso de ingeniería genética, cuyo objetivo ha sido la protección tanto contra fagos ya existentes como emergentes (Sturino y Klaenhammer, 2004; Reinheimer, 2005; Quiberoni y col., 2011). Entre ellos, se pueden mencionar: **Per (Phage-encoded resistance)**, **Estrategia “ARN antisentido” (antisense RNA)** y **Sistema “suicida”**.

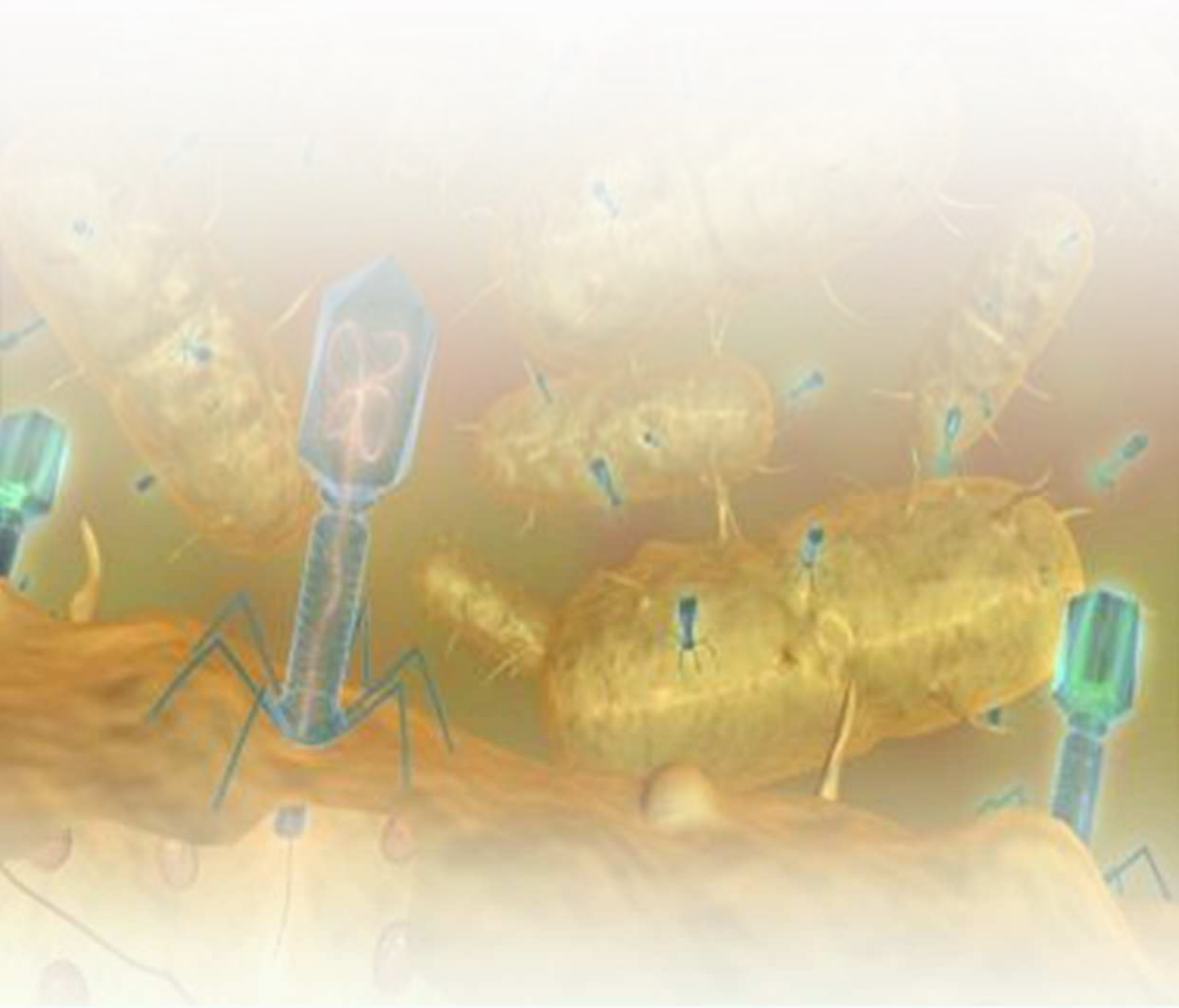
Estas técnicas son altamente efectivas, aunque parecen tener un espectro de resistencia mucho más acotado que los sistemas de defensa naturales (Moineau, 1999; Josephsen y Neve, 2004; Sturino y Klaenhammer, 2004).

Si bien estos sistemas de defensa han sido probados en el laboratorio, es muy poco probable que puedan ser utilizadas para aplicaciones industriales debido a las restricciones reglamentarias ligadas a ellos (Moineau, 1999; Quiberoni y col., 2011).

2.7.4. Cepas insensibles a fagos: cepas salvajes

Existen ciertas cepas que resisten los constantes ataques de todo tipo de fagos, manteniendo la resistencia por períodos de tiempo prolongados. Esta resistencia puede ser una característica innata de la cepa, la cual puede poseer de manera natural los mecanismos de defensa necesarios para comportarse resistente frente a los ataques fágicos. Si estas cepas, además de exhibir una fago resistencia prolongada, presentan características tecnológicas adecuadas, serían candidatos ideales para ser utilizadas a nivel industrial en los procesos fermentativos (Guglielmotti, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

En los experimentos que se describen a continuación se utilizó la cepa *Lb. plantarum* ATCC 8014 como cepa hospedadora y los bacteriofagos B1, B2, FAGK1 y FAGK2. La metodología básica aplicada en todos los estudios es la descrita en el punto 3 del capítulo 1.

Además, para los ensayos de inactivación fotocatalítica, se utilizaron cepas y fagos pertenecientes a diferentes especies bacterianas. Los mismos se detallan a continuación.

1. Cepas

En este capítulo se utilizaron dos cepas de *St. thermophilus*, una cepa perteneciente a la especie *L. lactis*, dos de *Lb. helveticus*, cuatro cepas de *Lb. delbrueckii*, una de *Lb. casei* y una de *Lb. paracasei*. Las cepas, así también como su origen y temperatura óptima de desarrollo, se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Cepas de diversas especies de bacterias lácticas utilizadas en los ensayos de inactivación fotocatalítica.

Microorganismo	Cepa	Temperatura óptima de desarrollo
<i>Lactococcus lactis</i>	C12	30°C
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST13.2	43°C
	JB-15	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 15807	43°C
	CNRZ 892	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	V	43°C
	Ib ₃	
	342	
	204	
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 27139	37°C
<i>Lactobacillus paracasei</i>	A	37°C

1.1. Conservación y reactivación de las cepas

Las cepas bacterianas fueron conservadas por congelamiento a -20°C y -80°C utilizando caldo Elliker (lactococos y estreptococos) o caldo MRS (lactobacilos) suplementados con glicerol (15% v/v), como crioprotector. Para ello, las cepas fueron desarrolladas previamente durante 16-18 hs en el medio de cultivo adecuado y a su temperatura óptima de desarrollo. Estos cultivos fueron adicionados al 20% a la solución crioprotectora, repartidos en alícuotas de 1 ml en crioviales estériles, y luego congelados a -20 y a -80°C .

Para su reactivación, las cepas congeladas fueron inoculadas al 2% en el medio de cultivo adecuado e incubadas a su correspondiente temperatura de desarrollo durante 16-18 hs. Para su posterior uso en los diferentes ensayos, las cepas fueron reinoculadas en el mismo medio de cultivo e incubadas a la temperatura correspondiente durante 16-18 hs.

2. Bacteriofagos

Los fagos utilizados en los ensayos de inactivación fotocálitica junto con sus cepas hospedadoras se detallan a continuación en la Tabla 15.

3. Metodología general empleada para el estudio de fagos de bacterias lácticas

3.1. Conservación de los fagos

Los fagos fueron conservados en heladera (4°C) como un stock filtrado de alto título. También se dispuso de una reserva almacenada a -20°C y a -80°C de las suspensiones fágicas (en caldo MRS o Elliker según corresponda) adicionadas de glicerol (15% v/v).

3.2. Propagación de los fagos

Se empleó igual metodología que la descrita en 3.2 (capítulo 1), empleando el medio de cultivo correspondiente y realizando las incubaciones a la temperatura óptima de desarrollo de cada especie.

Las dosis infectivas (m.o.i.) utilizadas para llevar a cabo la propagación de las partículas fágicas fueron 0,4 para *Lb. helveticus*, 0,7 para *Lb. delbrueckii* mientras que para *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *St. thermophilus* y *L. lactis* la m.o.i. utilizada fue 0,5.

Tabla 15. Fagos utilizados en los ensayos de inactivación fotocatalítica.

Microorganismo	Fago	Cepa hospedadora	Origen del fago	Clasificación del fago	Referencia
<i>Lactococcus lactis</i>	CHD	CI2	Suero de queso Danbo (Argentina)	<i>Siphoviridae</i>	Suárez y col., 2008a
	QF9	CI2	Suero de queso Fynbo (Argentina)	<i>Siphoviridae</i>	Suárez y col., 2008a
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ALQ13.2	ST13.2	Planta quesera	<i>Siphoviridae</i>	Quiberoni y col., 2006
	OBJ	JB-15	Suero de queso Cuartirolo (Argentina)	<i>Siphoviridae</i>	Quiberoni y col., 2000
<i>Lactobacillus helveticus</i>	15807-B1	ATCC 15807	ATCC	<i>Myoviridae</i>	-
	832-B1	CNRZ 892	CNRZ	<i>Myoviridae</i>	-
	0241	CNRZ 892	CNRZ	<i>Myoviridae</i>	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	BYM	V	Yogur (Argentina)	<i>Siphoviridae</i>	Quiberoni y col., 2003
	Ib ₃	Ib ₃	Yogur (Argentina)	<i>Siphoviridae</i>	Quiberoni y col., 2003
	342	342	Yogur (Italia)	<i>Siphoviridae</i>	Suárez y col., 2008b
	204	204	Suero natural (Provolone; Italia)	<i>Siphoviridae</i>	Suárez y col., 2008b
<i>Lactobacillus casei</i>	J-1	ATCC 27139	ATCC	<i>Siphoviridae</i>	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	MLC-A	A	Producto lácteo probiótico (Argentina)	<i>Siphoviridae</i>	Capra y col., 2006a

3.3. Titulación de fagos

La concentración de partículas fágicas fue determinada por el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991) siguiendo igual metodología que la descrita en 3.3 (capítulo1) y utilizando como medio de cultivo MRS (lactobacilos) o M17 (lactococos y estreptococos).

Las suspensiones celulares de las diferentes cepas estudiadas se prepararon como se detalla a continuación. Para las cepas de *Lb. delbrueckii*, *St. thermophilus* y *L. lactis* se partió de un cultivo en leche descremada reconstituída (LDR, leche descremada en polvo, al 10%

m/v), se tomó 1 ml de este cultivo y se lo transfirió a 5 ml de caldo MRS (lactobacilos) o Elliker (estreptococos y lactococos). Por su parte, 0,1 ml de un cultivo overnight en caldo MRS de las cepas de *Lb. helveticus* fueron añadidos a 5 ml del mismo medio de cultivo e incubados a 43°C hasta una D.O._{560nm} de 0,4 aproximadamente. Con respecto a las cepas de *Lb. casei* y *Lb. paracasei*, se agregaron 0,3 ml del cultivo a 5 ml de caldo MRS.

En los tubos de hemólisis conteniendo 100 µl de la dilución fágica a testear y CaCl₂ (50 mM), se adicionaron 100 µl de la suspensión celular (preparada de acuerdo al detalle del párrafo anterior) para todas las especies bacterianas estudiadas, con excepción de *L. lactis*, en cuyo caso se adicionaron 50 µl de dicha suspensión.

Las cajas de Petri fueron incubadas a la temperatura óptima de desarrollo de la cepa a excepción de *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *St. thermophilus* cuyas incubaciones se realizaron a 34°C (lactobacilos) y 37°C (estreptococos).

4. Resistencia térmica y química de los bacteriofagos

4.1. Cinéticas de inactivación térmica

Se llevaron a cabo estudios de inactivación térmica de los fagos, en cuatro medios de suspensión diferentes: caldo MRS, buffer TMG, LDR y medio comercial reconstituido EM (a base de leche en polvo descremada, suero en polvo, extracto de levadura, sales bufferizantes y aminoácidos; 6% m/v) adicionado de glucosa (1% m/v) (medio EM-glucosa, utilizado a nivel industrial para la propagación de bacterias probióticas). Las temperaturas elegidas para los ensayos correspondieron a las utilizadas normalmente en la industria para el tratamiento de la leche cruda en distintos procesos (63°C, 72°C y 90°C). Los controles fueron mantenidos a temperatura ambiente (25°C).

Las suspensiones fágicas en estudio se inocularon en cada uno de los medios seleccionados (caldo MRS, buffer TMG, LDR, medio EM-glucosa), de tal manera de obtener una concentración inicial de aproximadamente 10⁶ UFP/ml, distribuyéndose luego en tubos Eppendorf (alícuotas de 1 ml) los cuales fueron mantenidos a las temperaturas preestablecidas en baños de agua termostatizados. A intervalos de tiempo predeterminados (2, 5, 15, 30 y 45 min), los tubos fueron retirados del baño e inmediatamente refrigerados (baño de hielo), para luego determinar la concentración de partículas fágicas infectivas. Estos resultados fueron graficados en función del tiempo, para construir las curvas de inactivación térmica a cada una de las temperaturas ensayadas, en los cuatro medios de suspensión. A partir de dichas curvas de supervivencia se determinó, para cada condición, el tiempo necesario para inactivar el 99% de las partículas fágicas iniciales (T₉₉).

4.2. Cinéticas de inactivación química

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

Ambos alcoholes y el ácido peracético fueron diluidos en agua destilada estéril hasta la concentración deseada, mientras que las suspensiones de hipoclorito de sodio se realizaron en buffer fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 0,1 M, pH= 7). El pH resultante de la solución de ácido peracético fue 2,3 mientras que el de las soluciones restantes fue cercano a la neutralidad. Las partículas fágicas, ensayadas a una concentración inicial de 10^6 UFP/ml aproximadamente, fueron incubadas en cada uno de los biocidas a las temperaturas fijadas. A intervalos de tiempo preseleccionados, se tomaron alícuotas de las diluciones (100 μ l), titulándolas de inmediato, para determinar la concentración de bacteriofagos viables. Los resultados fueron graficados en función del tiempo, para construir las curvas de inactivación química. El tiempo necesario para inactivar el 99% de las partículas fágicas iniciales (T_{99}) fue determinado a partir de dichas curvas.

5. Inactivación fotoquímica y fotocatalítica de bacteriofagos

El objetivo de estos estudios fue la evaluación de la eficiencia de tratamientos fotocatalíticos (usando TiO_2 como catalizador) en la inactivación fágica. La metodología empleada simula las condiciones de bioaerosoles conteniendo las partículas fágicas.

Con el objetivo de comparar la eficiencia de la fotocatálisis, los estudios fueron realizados para fagos de diversas especies de bacterias lácticas (Tabla 15). Para los cuatro fagos de *Lb. plantarum* (B1, B2, FAGK1 y FAGK2), además de los estudios de inactivación fotocatalítica, también se llevaron a cabo estudios de inactivación fotoquímica.

A continuación se detallarán, en primer lugar la metodología empleada en los ensayos de inactivación fotoquímica/fotocatalítica y luego el modelo matemático empleado para el cálculo de la eficiencia de inactivación fotocatalítica.

5.1. Ensayos de inactivación fotoquímica/fotocatalítica

El reactor de laboratorio utilizado en este estudio fue diseñado por el grupo de trabajo dirigido por el Dr. Orlando Alfano (Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria

Química - INTEC, UNL-CONICET, Santa Fe, Argentina). El mismo cuenta con dos compartimentos separados: una fuente de emisión y una cámara de irradiación. El sistema de emisión está formado por una estructura metálica, la cual aloja 7 lámparas UV de 8 W con un máximo de emisión en 350 nm y está provisto de un panel de control que posee un interruptor general como así también interruptores individuales para cada lámpara UV. Su función es generar la radiación UV necesaria para activar el catalizador (TiO_2). Por otro lado, la cámara de irradiación es una caja metálica, abierta en su cara superior, en la cual se ubicaron las suspensiones fágicas a irradiar. Este compartimento se encuentra cerrado por un vidrio de borosilicato ubicado en la cara superior de la cámara, el cual permite mantener la esterilidad en el interior del mismo y preservar la humedad interna generada (Figura 38).

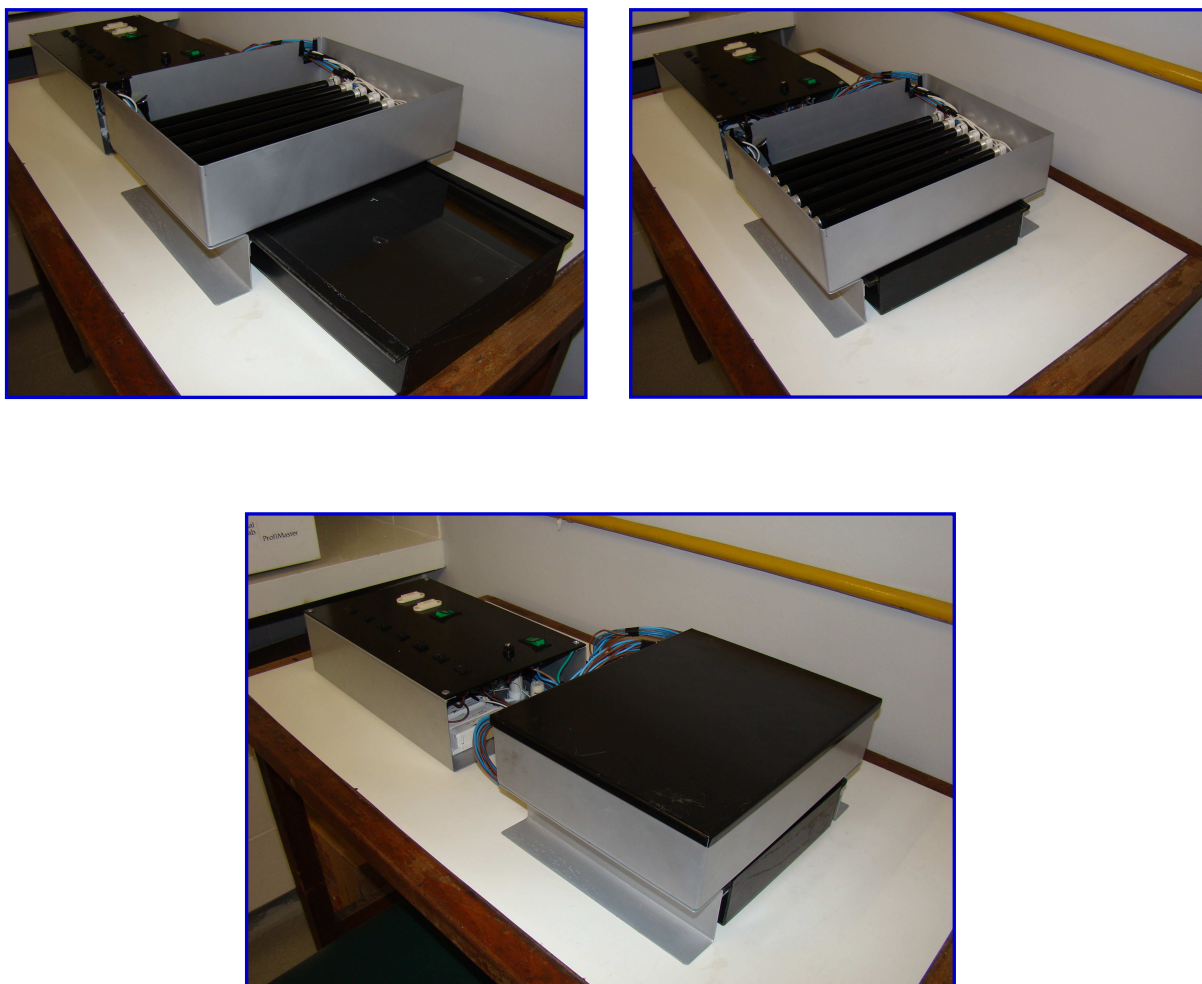


Figura 38. Fotorreactor utilizado en los ensayos de inactivación fotoquímica/fotocatalítica.

Para llevar a cabo la inactivación fotocatalítica, las suspensiones fágicas fueron depositadas en soportes ($2 \times 5 \times 0,3$ cm) con recubrimiento de TiO_2 . Los mismos se

obtuvieron recubriendo placas de vidrio de borosilicato con una suspensión de nanopartículas de TiO_2 preparada por la técnica de sol-gel por el grupo dirigido por el Dr. Alfano (Zacarías y col., 2010).

Sobre las suspensiones fágicas depositadas, se colocaron cubremuestras. Para ello, láminas rectangulares de bronce de $50 \mu\text{m}$ de espesor se adhirieron a los bordes laterales de las mismas placas de vidrio de borosilicato utilizadas para los soportes (Figura 39). Esto se realizó con el objetivo de obtener una separación reproducible entre los pares soporte/cubremuestra (aproximadamente $85 \mu\text{m}$), definiéndose así el volumen de reacción. Se seleccionó el borosilicato como material de las placas debido a que es un material transparente a las radiaciones UV-A, lo cual es indispensable para que la radiación atraviese el cubremuestra y alcance a las partículas fágicas.

El uso de los cubremuestras tiene como objetivo generar una delgada película ($85 \mu\text{m}$) de las suspensiones fágicas, lo cual podría simular la inactivación en gotas de un bioaerosol dentro de un fotorreactor destinado a la desinfección del aire, ya que cada gota del bioaerosol que queda retenida en las paredes del reactor poseería un espesor delgado, similar al espesor generado entre el soporte y el cubremuestra.

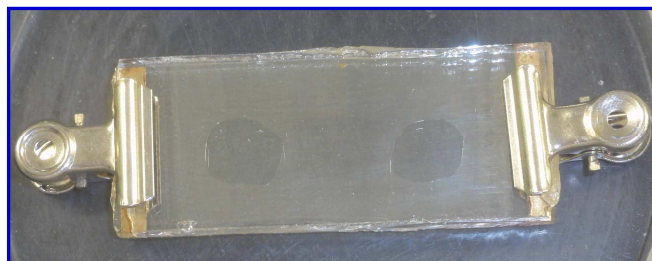


Figura 39. Placas conteniendo las suspensiones fágicas, utilizadas en los ensayos de inactivación fotoquímica/fotocatalítica.

Previo al tratamiento de inactivación, las suspensiones fágicas fueron diluidas en agua destilada estéril hasta una concentración aproximada de 10^7 UFP/ml. Luego se colocaron $20 \mu\text{l}$ de la dilución en el soporte recubierto con el catalizador y se cubrió con un cubremuestra. Ambas placas se sujetaron con pinzas en sus extremos para lograr un espesor uniforme (Figura 39). Se testearon dos fagos por cada soporte utilizado.

Posteriormente, las placas se colocaron en el fotorreactor y se irradiaron durante un máximo de 3 hs, determinándose a intervalos de tiempo preestablecidos la concentración de fagos mediante el método de la doble capa agarizada. Los resultados fueron graficados en función del tiempo.

Para evitar la evaporación de las muestras, se generó un ambiente saturado de vapor de agua en el interior de la cámara de irradiación del fotorreactor. Esto se logró colocando pequeños recipientes con agua estéril en el piso de la cámara de irradiación, los cuales también sirvieron de apoyo para las placas.

La temperatura y la humedad relativa dentro de la cámara de irradiación fueron controladas y mantenidas a 40°C y 89,5%, respectivamente, durante todo el experimento.

Los estudios de inactivación fotoquímica fueron llevados a cabo de la misma manera que los ensayos de inactivación fotocatalítica, sólo que las placas de vidrio de borosilicato usadas como placas soporte no estuvieron recubiertas por el catalizador (TiO₂).

5.2. Medida del flujo de energía radiante neta

Para evaluar la eficiencia de inactivación fotocatalítica de los bacteriofagos es necesario determinar el flujo de radiación neta incidente sobre las placas cubiertas con el catalizador (TiO₂). Para llevar a cabo estas mediciones, se utilizó un radiómetro (IL 1700 Research Radiometer from International Light), provisto de sensor (SED005 #316), filtro (WBS320 #16789) y difusor óptico (W #7698).

5.3. Determinación de la velocidad de absorción superficial de fotones (SRPA)

La velocidad de generación de los radicales libres en la superficie de la película de TiO₂, agentes oxidantes capaces de producir la inactivación de los fagos, es proporcional a la velocidad de absorción superficial de fotones (SRPA). La SRPA puede ser obtenida considerando:

(i) El flujo de radiación neta recibido por las placas recubiertas por el catalizador.

(ii) La fracción de energía absorbida por el film de catalizador.

De un balance local de energía radiante en el film de TiO₂ (en términos de flujos locales netos de radiación), la SRPA puede ser determinada para cada punto del film de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$e_f^{a,s}(\underline{x}) = q_{f,in}(\underline{x}) - q_{f,tr}(\underline{x}) - q_{f,rf}(\underline{x}) \quad (1)$$

Donde: $q_{f,in}(\underline{x})$ flujo local de energía radiante incidente

$q_{f,tr}(x)$ flujo local de energía radiante transmitida a través de la superficie catalítica.

$q_{f,rf}(x)$ flujo local de energía radiante reflejada por la superficie de TiO₂.

Considerando que el flujo de energía radiante neta incidente es uniforme sobre la superficie irradiada, los valores promedios de los flujos de energía radiante neta pueden ser utilizados para obtener la velocidad de absorción de fotones, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\langle e_f^{a,s} \rangle_{A_{irr}} = \langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} - \langle q_{f,tr} \rangle_{A_{irr}} - \langle q_{f,rf} \rangle_{A_{irr}} = \langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} \alpha_f \quad (2)$$

Donde α_f es la fracción de energía absorbida por el film de TiO₂:

$$\alpha_f = \frac{\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} - \langle q_{f,tr} \rangle_{A_{irr}} - \langle q_{f,rf} \rangle_{A_{irr}}}{\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}}} \quad (3)$$

Para evaluar α_f , se necesitan los siguientes parámetros ópticos:

- (i) Transmitancia espectral difusa (T_g) y Reflectancia espectral difusa (R_g) de las placas de borosilicato sin recubrimiento
- (ii) Transmitancia espectral difusa (T_{fg}) y Reflectancia espectral difusa (R_{fg}) de la placa de borosilicato con el film de TiO₂

Los valores de R y T fueron obtenidos utilizando un espectroradiómetro (Optronic OL serie 750) acoplado a un accesorio de esfera integradora (OL 740-70), trabajando en un rango de longitud de onda de entre 310 y 390 nm.

6. Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas de *Lactobacillus plantarum*

Con el objetivo de aislar mutantes espontáneos resistentes a fagos a partir de cepas fago sensibles, se utilizaron las cepas *Lb. plantarum* ATCC 8014 y *Lb. plantarum* PLN y los dos fagos de colección, B1 y B2. Para *Lb. plantarum* ATCC 8014, el aislamiento de los mutantes fagorresistentes se llevó a cabo utilizando cada fago de manera individual o una combinación de ambos (cóctel de fagos). Para la cepa PLN sólo se ensayó el fago B2.

6.1. Metodologías utilizadas en el aislamiento de los mutantes fagorresistentes

6.1.1. Medio agarizado (MA)

Esta metodología fue utilizada solamente para la obtención de variantes fagorresistentes a partir de la cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014.

Volúmenes de 0,3 ml de la suspensión celular de la cepa sensible (50 µl de un cultivo desarrollado por 16-18 hs en 5 ml de caldo MRS fresco) fueron adicionados de los fagos específicos, a diferentes dosis infectivas (m.o.i. = $5,0 \times 10^{-3}$ - $5,0 \times 10^{-5}$) y de 3 ml de MRS soft agar. Cuando se utilizaron cócteles de fagos para el aislamiento de las variantes fagorresistentes, los fagos fueron agregados en volúmenes tal que la m.o.i. esté comprendida entre los valores anteriormente descritos (m.o.i. = $5,0 \times 10^{-3}$ - $5,0 \times 10^{-5}$). Estas mezclas, suavemente homogeneizadas, se volcaron sobre cajas de Petri conteniendo agar MRS-Ca-Gli. Luego de una incubación en microaerofilia a 37°C durante 16-18 hs, se examinó el desarrollo del cultivo infectado. Se seleccionaron las cajas de Petri que mostraron lisis completa del cultivo luego de este período de incubación (16-18 hs), descartándose las restantes. Se continuó la incubación de las placas seleccionadas para permitir el desarrollo de colonias resistentes a partir del cultivo lisado. Se aislaron las colonias obtenidas, que fueron consideradas como probables variantes fago resistentes (Reinheimer y col., 1993).

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

6.1.2. Cultivos secundarios (CS)

Un cultivo de la cepa sensible incubado por 16-18 hs, fue inoculado al 1% en caldo MRS-Ca e infectado con una suspensión fágica de alto título, a diversas dosis infectivas (m.o.i. = 2 - $2,0 \times 10^{-2}$). Como se describió en la técnica anterior, los fagos del cóctel fueron agregados en volúmenes tal que la m.o.i. esté comprendida entre los valores anteriormente descritos (m.o.i. = 2 - $2,0 \times 10^{-2}$). Durante la incubación a 37°C, se monitoreó la evolución de los cultivos infectados, comparándolos con un control de las cepas sin infectar. Se seleccionaron aquellos cultivos que lisaron completamente en el transcurso del día, y que evidenciaron desarrollo posterior (cultivo secundario), luego de 24-72 hs adicionales a 37°C. Seguidamente, esos cultivos se estriaron en placas de agar MRS, se incubaron (48 hs, 37°C) y se aislaron clones a partir de las colonias obtenidas (Callegari, 1992; Carminati y col., 1993).

7. Caracterización del fenotipo fagorresistencia

Para llevar a cabo estos ensayos en los mutantes obtenidos utilizando cócteles de fagos, cada mutante fue testeado con cada fago por separado.

7.1. Confirmación de la fagorresistencia

Se aplicó el test de turbidez (Svensson y Christiansson, 1991) con el objetivo de confirmar el fenotipo fagorresistencia de los clones aislados. Para ello, cada mutante presuntivo fue inoculado en un tubo conteniendo 5 ml de caldo MRS-Ca y la correspondiente dosis de fago (m.o.i. = 1, aproximadamente). El fago utilizado en cada caso fue aquel capaz de infectar a la cepa sensible de la cual se obtuvieron los mutantes correspondientes. Los mutantes inoculados en caldo MRS-Ca fueron incubados a 37°C, controlando el aumento de la turbidez (por desarrollo del cultivo). Estos cultivos fueron comparados con tubos control, los cuales se inocularon sólo con el mutante (sin agregado de fago). Aquellos tubos que no presentaron lisis (disminución de turbidez) luego de la incubación, fueron repicados nuevamente en tubos conteniendo 5 ml de caldo MRS-Ca. En total, se realizaron tres repiques sucesivos (en caldo MRS-Ca) de cada uno de los mutantes fagorresistentes presuntivos aislados. Aquellos capaces de resistir los tres repiques, fueron retenidos como verdaderos mutantes resistentes a fagos (Reinheimer y col., 1993).

Los mutantes fagorresistentes confirmados fueron congelados en caldo MRS adicionado de glicerol (15% v/v) a -20°C y -80°C.

7.2. Eficiencia en la recuperación de mutantes fagorresistentes

La eficiencia de cada metodología fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia} = (\text{N}^\circ \text{ de mutantes fagorresistentes confirmados} / \text{N}^\circ \text{ de mutantes fagorresistentes presuntivos}) \times 100$$

7.3. Estabilidad de la fagorresistencia

Una vez confirmada la fagorresistencia de los mutantes aislados, se procedió a estudiar si esta propiedad se mantenía bajo presión fágica, es decir, con el agregado de nuevas dosis de fago en cada repique sucesivo realizado. Se efectuaron siete repiques sucesivos de los mutantes en caldo MRS-Ca, siendo infectados en cada uno de ellos con una nueva dosis del fago utilizado para su aislamiento (m.o.i. aproximado de 1), asegurando la fuerte y continua presión fágica. Estos repiques se incubaron a 37°C, registrándose el número del repique en el cual el mutante resultó lisado por el fago (Carminati y col., 1993).

7.4. Nivel de fagorresistencia (EOP, Efficiency of Plaquing)

Una suspensión del fago (10^9 UFP/ml, aproximadamente) en caldo MRS, fue titulada (técnica de la doble capa agarizada) en paralelo sobre un cultivo de la cepa sensible respectiva y sobre un cultivo del mutante fagorresistente estudiado, utilizando agar MRS-Ca-Gli y MRS soft-agar. La relación entre el título fágico obtenido con el mutante resistente y el logrado con la cepa sensible se definió como EOP (Séchaud y col., 1989).

7.5. Lisogenia

7.5.1. Liberación espontánea de partículas fágicas

Para investigar la posibilidad de resistencia debida a lisogenia en las variantes fagorresistentes aisladas, se desarrolló un cultivo de los mismos en caldo MRS durante 16-18 hs (37°C), se sometió a centrifugación (5 min, 10000 g) y se tituló el sobrenadante sobre la cepa sensible correspondiente en agar MRS-Ca-Gli, mediante la técnica de la doble capa agarizada anteriormente descrita. La eventual liberación espontánea de partículas fágicas produce placas de lisis visibles (Cluzel y col., 1987).

7.5.2. Inducción de profagos con mitomicina C

Un cultivo obtenido por incubación durante 16-18 hs de la cepa en estudio fue inoculado (1%) en caldo MRS-Ca fresco e incubado a 37°C hasta alcanzar una D.O._{560nm} de 0,2 aproximadamente. Luego, diferentes concentraciones de mitomicina C (0,4, 0,6 y 0,8 $\mu\text{g/ml}$) fueron adicionadas a los cultivos que se incubaron a 30°C (para limitar la velocidad de desarrollo bacteriano). A tiempos preestablecidos, se midió la D.O._{560nm} y se la comparó con la del cultivo control (sin agregado de mitomicina C) (Mercanti y col., 2011).

7.6. Tasas de adsorción fágica

Se determinó el nivel de adsorción de los respectivos fagos sobre cada mutante espontáneo fagorresistente y sobre la cepa sensible (control).

Los ensayos de adsorción fueron llevados a cabo de acuerdo a lo descrito en 5.4 (capítulo 1). Los resultados fueron expresados como porcentaje de adsorción y fueron comparados con aquellos obtenidos utilizando la cepa sensible (control).

8. Caracterización de los mutantes fagorresistentes

8.1. Morfología

Se observó la morfología de las colonias de los mutantes espontáneos fagorresistentes desarrolladas por estriado en agar MRS (37°C, 48 hs), comparándolas con la morfología de las cepas sensibles.

La morfología celular fue determinada a través de observación directa al microscopio óptico a partir de preparados en gota fresca, con inmersión, contraste de fases y aumento de 1000x.

8.2. Espectro de hospedadores de los mutantes fagorresistentes

La resistencia de los mutantes respecto a los fagos líticos (B1 o B2) se estudió mediante el test de turbidez. Con esa finalidad, cultivos en caldo MRS-Ca de los mutantes se pusieron en contacto con dosis de los fagos B1 o B2. Se utilizaron como control tubos conteniendo cultivos de los mutantes sin agregado de fago. Se realizaron tres repiques sucesivos (en caldo MRS-Ca) de cada mutante fagorresistente con los fagos testeados.

8.3. Estudios genéticos

8.3.1. Extracción del ADN total bacteriano

Un cultivo de las células desarrollado durante 16-18 hs en 5 ml de caldo MRS fue centrifugado a 6000 g durante 15 min. El pellet obtenido fue resuspendido y lavado dos veces con 1 ml de buffer de lisis (6,7% sacarosa, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) con el objetivo de eliminar los restos de medio de cultivo ácido que pudieren inhibir la lisozima que se agregará posteriormente. El pellet finalmente fue resuspendido en 0,5 ml de buffer de lisis adicionado de 30 mg/ml de lisozima y 10 U de mutanolisina e incubado en hielo durante 1 h. Posteriormente se adicionaron 62,5 µl de SDS 10% y proteinasa K a una concentración final de 1mg/ml y se realizó una incubación durante 30 min a 65°C. Luego, se agregó RNAsa (50 µg/ml) incubándose durante 30 min a 65°C. Finalmente fueron agregados 10% v/v de Acetato de sodio (AcNa) 3M y se realizaron 3 extracciones con 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1), centrifugando durante 10 min entre cada extracción para recuperar el sobrenadante. El ADN se precipitó con 2,5 ml de etanol absoluto (-20°C) y se centrifugó (13000 g, 10 min, 4°C). El precipitado se lavó 3 veces con etanol 70% (v/v) centrifugando a 12000 g durante 5 min a 4°C entre cada lavado. Finalmente el ADN se secó, se resuspendió en 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se conservó a -20°C (Binetti y col., 2008).

El ADN fue cuantificado por electroforesis en geles de agarosa (0,8% m/v) en buffer TBE 1X (89 mM Tris-borato, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0), en presencia del colorante GelRedTM (Biotium, Inc., Hayward, CA) y posterior visualización en transiluminador (UV).

8.3.2. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction)

El grado de similitud (homología genética) entre la cepa madre, sensible a fagos, y los derivados fagorresistentes, se determinó mediante el análisis de sus perfiles RAPD. Para ello, se partió del ADN total bacteriano extraído y se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores (primers):

M13 (5'- GAGGGTGGCGGTTCT -3'; Huey y Hall, 1989; Stendid y col., 1994)

1254 (5'- CCGCAGCCAA -3'; Akopyanz y col., 1992)

B06 (5'- TGCTCTGCCC -3'; Binetti y col., 2007b)

B10 (5'- CTGCTGGGAC -3'; Binetti y col., 2007b)

El ensayo de PCR se realizó en un volumen total de 50 µl, conteniendo 5 µl de buffer de PCR 10X (200 mM Tris-HCl de pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen, Brasil), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen, Brasil), 200 µM de cada dNTP, 2,5 U de DNA *Taq* polimerasa (Invitrogen, Brasil), el correspondiente primer, ya sea M13 (2,0 µM), 1254 (0,8 µM), B06 (0,5 µM) o B10 (0,5 µM) y 1,0 µl de ADN bacteriano previamente diluido (1:100). Los programas de amplificación utilizados dependieron del primer empleado:

➤ **Primer M13:** ciclo inicial de 3 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturalización), 45°C durante 20 seg (hibridación) y 72°C durante 2 min (extensión).

➤ **Primer 1254:** 4 ciclos iniciales de 5 min a 94°C, 5 min a 36°C y 5 min a 72°C seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturalización), 1 min a 36°C (hibridación) y 2 min a 72°C (extensión).

➤ **Primers B06 y B10:** ciclo inicial de 5 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturalización), 2 min a 36°C (hibridación) y 2 min a 72°C (extensión).

Todos los programas finalizaron con un ciclo a 72°C durante 7 min (primers M13 y 1254) o 10 min (primers B06 y B10) (elongación final). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (1,3% m/v) en presencia del colorante GelRedTM (Biotium, Inc., Hayward, CA). Como marcador de peso molecular de ADN se utilizó 1 kb Plus DNA Ladder (GE Healthcare Life Sciences, Bucks, UK). Los perfiles de amplificación fueron fotografiados en un transiluminador UV mediante un sistema

digital (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290; EDAS 290, Celbio, Milán, Italia) provisto con el gabinete de captura de imágenes (EDAS 290), y guardadas como archivos TIFF. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas utilizando el software para análisis de perfiles de BioNumericsTM (Versión 6,0; Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Latem, Bélgica). El cálculo de similitudes de los perfiles se basó en el coeficiente r de Pearson, y las cepas fueron agrupadas usando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) (Vauterin y Vauterin, 1992).

8.4. Caracterización tecnológica

8.4.1. Selección de un medio de cultivo para desarrollo de los mutantes fagorresistentes

En primer lugar, fue evaluada la capacidad de los mutantes así como también de la cepa sensible de desarrollar en leche. Para ello las cepas fueron inoculadas (3%) en LDR e incubadas a 37°C, midiendo el pH a las 24 hs.

Para las cepas que desarrollaron en estas condiciones, se intentó realizar una cinética de acidificación, partiendo de un cultivo en caldo MRS de 16-18 hs, realizando dos repiques consecutivos en LDR adicionado de hidrolizado de caseína (0,25% m/v) (LDR-HC) y posteriormente un repique en LDR. Como no fue posible obtener un desarrollo adecuado de los mutantes en estas condiciones, se utilizó el medio comercial reconstituido EM-glucosa.

8.4.2. Desarrollo de los mutantes fagorresistentes en medios de base láctea

A partir de un cultivo en caldo MRS incubado a 37°C durante 16-18 hs de cada uno de los mutantes y de la cepa sensible, se inocularon (2%) 100 ml del medio EM-glucosa, repartiendo alícuotas de 10 ml en tubos de ensayo. Los tubos así repartidos fueron incubados a 37°C en baño termostático. A intervalos de tiempo preestablecidos (entre 0 y 24 hs), se retiraron los tubos y se determinaron los valores de pH, graficando su evolución en función del tiempo.

A las 24 hs de incubación se determinó, además, la acidez desarrollada, a través de titulación con una solución de NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,4. Los resultados se expresaron en grados Dornic (°D), calculado de la siguiente manera:

$$\text{Acidez (°D)} = [V_{\text{NaOH}} \times f_{\text{NaOH}} \times 100] / V_{\text{muestra}}$$

Donde: V_{NaOH} : volumen (en ml) de NaOH 0,1 N consumido en la titulación

f_{NaOH} : factor de normalización del NaOH.

V_{muestra} : volumen (en ml) de muestra titulada (cultivo en LDR)

8.4.3. Empleo de mutantes fagorresistentes en minielaboración de leche fermentada

Considerando el comportamiento obtenido durante la caracterización del fenotipo fagorresistencia y la capacidad de desarrollar en el medio EM-glucosa, se seleccionó una cepa mutante fagorresistente (MC4) para llevar a cabo estos estudios. Además, se incluyó en la experiencia, la cepa fago sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014.

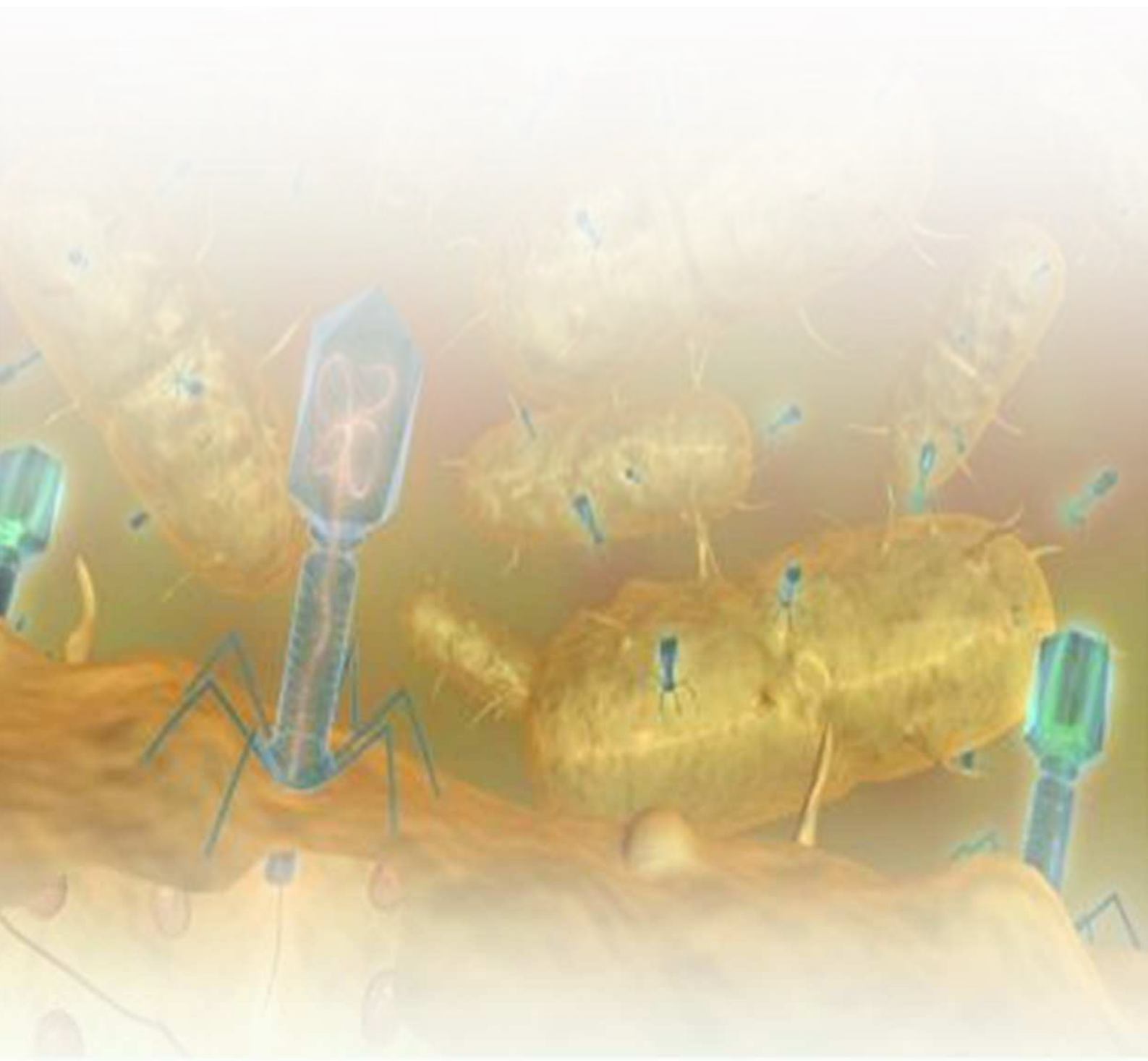
Alícuotas del medio de cultivo EM-glucosa fueron inoculadas (2%) con la cepa sensible y con la variante MC4. Ambos cultivos fueron divididos en dos alícuotas, infectando una de ellas con los dos fagos B1 y B2 simultáneamente (concentración final de la mezcla fágica: 10^4 UFP/ml) mientras que la otra se utilizó como control (cultivo sin infectar). Todos los cultivos (sensible y resistente, infectado y no infectado) fueron repartidos en tubos de ensayo e incubados a 37°C en baño termostatzado. A intervalos preestablecidos se determinó pH, recuento en superficie de células viables en MRS agarizado y recuento fágico por el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991). La elaboración se continuó hasta que los cultivos sin infectar alcanzaron valores de pH cercanos a 4,4. Alcanzado este punto, las muestras se retiraron del baño termostatzado y fueron almacenadas en bodega refrigerada a $13 \pm 1^\circ\text{C}$.

Con los datos obtenidos se graficaron las curvas de cinética de acidificación (pH vs tiempo) y evolución de los recuentos celulares (UFC/ml vs tiempo) y fágicos (UFP/ml vs tiempo).

Viabilidad celular y fágica durante el almacenamiento refrigerado

Simulando las condiciones del producto en góndola, se realizó el seguimiento, por un período de 21 días (a intervalos de 7 días), determinándose pH, recuento celular y de partículas fágicas infectivas en las muestras.

RESULTADOS



RESULTADOS

1. Resistencia térmica y química de los bacteriofagos

1.1. Cinéticas de inactivación térmica

Cuando se estudió la resistencia térmica, los cuatro fagos en general, mostraron similar comportamiento frente a los tratamientos a 63°C y 72°C en los diferentes medios de suspensión (MRS, buffer TMG, leche y medio EM-glucosa).

Con respecto al tratamiento a 63°C, una fuerte resistencia fue exhibida ($T_{99} > 45$ min) (Tabla 16), observándose reducciones en los recuentos fágicos de entre 0,3 y 1,2 órdenes logarítmicos, dependiendo del fago y del medio de suspensión estudiado (Figura 40).

Cuando las suspensiones fágicas fueron calentadas a 72°C, se observaron importantes reducciones en el número de partículas fágicas viables (pérdidas de entre 4 y 5,5 órdenes logarítmicos). Sin embargo, este tratamiento no fue suficiente para lograr la completa inactivación de los fagos dentro de los 45 min de tratamiento. En estas condiciones se obtuvieron valores de T_{99} comprendidos entre 5,6 y 11,7 min, dependiendo del fago y del medio de suspensión utilizados.

En general, el medio de suspensión no afectó la resistencia térmica de los fagos. Sin embargo, el fago FAGK2 mostró diferencias en su comportamiento a 72°C en los cuatro medios ensayados (Figura 40). Teniendo en cuenta los valores de T_{99} , en MRS y TMG, una menor resistencia térmica fue observada para todos los fagos con excepción del fago B1, el cual evidenció mayor resistencia en MRS.

Un tratamiento a 90°C por 5 min fue suficiente para lograr recuentos menores a 10 UFP/ml en todos los medios de suspensión y para los cuatro fagos estudiados (datos no mostrados).

Tabla 16. Resistencia térmica (T_{99}) de los fagos B1, B2, FAGK1 y FAGK2 en diferentes medios de suspensión. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Fago	MRS		LDR		EM-glucosa		TMG	
	63°C	72°C	63°C	72°C	63°C	72°C	63°C	72°C
B1	>45	10,0 \pm 0,6	>45	7,2 \pm 0,3	>45	8,6 \pm 0,6	>45	5,8 \pm 0,2
B2	>45	6,0 \pm 0,4	>45	11,6 \pm 0,5	>45	10,5 \pm 0,3	>45	6,5 \pm 0,3
FAGK1	>45	7,5 \pm 0,4	>45	11,7 \pm 0,6	>45	11,7 \pm 0,5	>45	6,9 \pm 0,4
FAGK2	>45	5,6 \pm 0,3	>45	9,7 \pm 0,3	>45	8,2 \pm 0,4	>45	6,6 \pm 0,4

T_{99} : Tiempo (min) para lograr la inactivación del 99% de partículas fágicas.

MRS: Man Rogosa Sharp; LDR: leche descremada reconstituida; buffer TMG: buffer Tris-Magnesio-Gelatina.

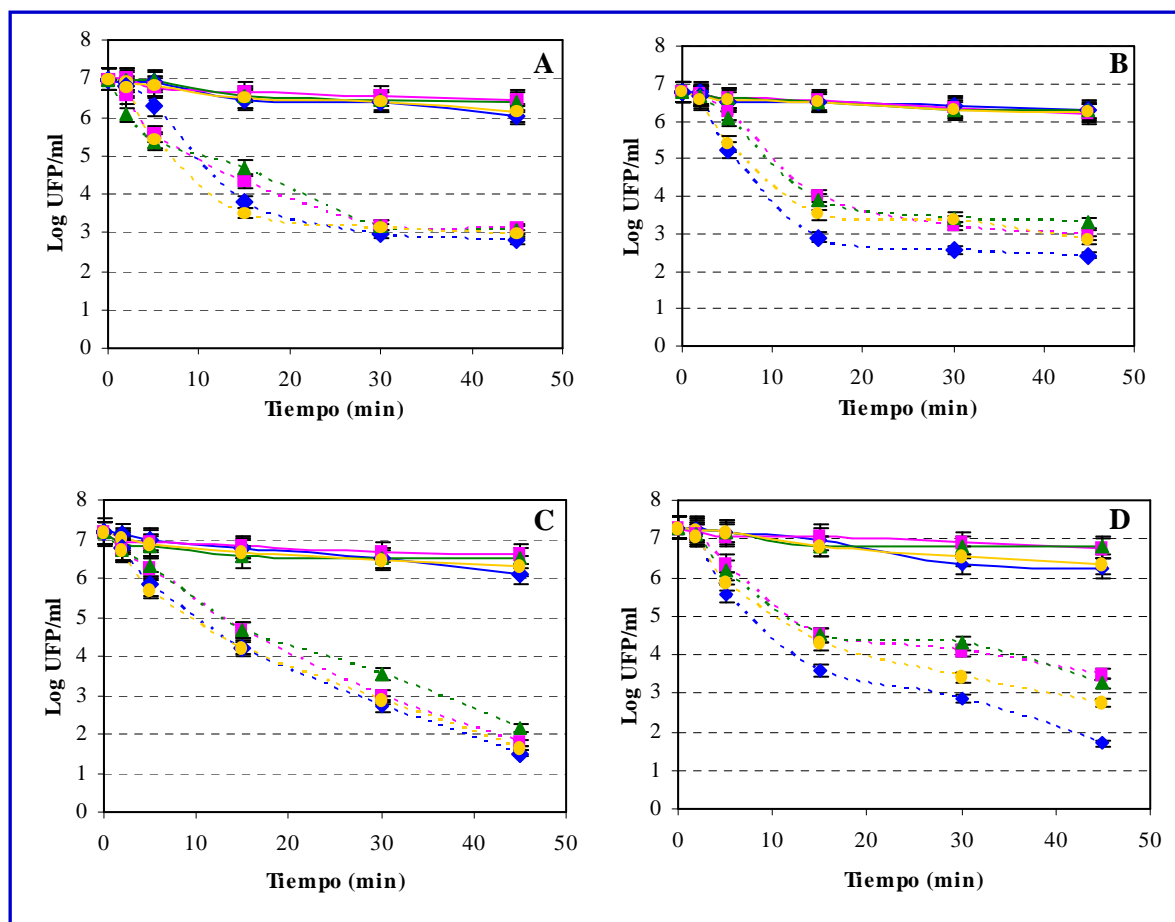


Figura 40. Cinéticas de inactivación térmica de los fagos B1 (A), B2 (B), FAGK1 (C) y FAGK2 (D) a 63°C (—) y 72°C (----) en MRS (◆), LDR (■), EM-glucosa (▲) y TMG (●). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

1.2. Cinéticas de inactivación química

El ácido peracético en una concentración de 0,15% fue el biocida más efectivo ya que causó la más rápida inactivación fágica. Ninguno de los fagos fue detectado luego de 5 min de tratamiento, obteniéndose valores de T_{99} inferiores a 5 min (datos no mostrados). Con respecto al tratamiento con alcoholes (etanol e isopropanol), se observó un comportamiento similar para los cuatro fagos estudiados. Entre todas las concentraciones de alcohol ensayadas, el etanol al 100% produjo la mayor inactivación fágica (Figura 41) aunque no fue posible lograr la completa inactivación de los fagos aún después de 45 min de tratamiento (pérdidas de 3 a 4 órdenes logarítmicos). Los valores de T_{99} obtenidos en estas condiciones estuvieron comprendidos entre 3,7 y 7,4 min (Tabla 17). El etanol ensayado en una concentración de 10%, no tuvo efecto en la viabilidad fágica ($T_{99} > 45$ min). Sin embargo, una concentración de 50% de dicho alcohol fue más efectiva que 75%. Los valores de T_{99} obtenidos en estas condiciones estuvieron comprendidos entre 8,3 y 14,8 min y entre 29,0 y

44,6 min (con excepción del fago FAGK2 para el cual el valor de T_{99} fue mayor a 45 min) respectivamente.

Todos los fagos fueron escasamente afectados por el isopropanol. Para todas las concentraciones ensayadas se obtuvieron valores de T_{99} mayores a 45 min (datos no mostrados).

Cuando el hipoclorito de sodio fue ensayado a una concentración de 200 ppm, fueron obtenidas pérdidas de viabilidad de 2 órdenes logarítmicos y valores de T_{99} mayores a 45 min. Por otro lado, 400 ppm de este biocida produjeron pérdidas de viabilidad de 3 órdenes logarítmicos para los fagos B2, FAGK1 y FAGK2, mientras que para el fago B1 la misma fue de 4 órdenes logarítmicos (Figura 41). Los valores de T_{99} estuvieron comprendidos entre 2,5 y 4,3 min (Tabla 17). Finalmente, 800 ppm de hipoclorito de sodio produjeron recuentos fágicos menores a 10 UFP/ml dentro de los 15 min para el fago B2 y dentro de los 30 min de tratamiento para los fagos B1, FAGK1 y FAGK2.

Tabla 17. Resistencia (T_{99}) de los fagos B1, B2, FAGK1 y FAGK2 a etanol e hipoclorito de sodio. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Fago	Etanol (% v/v)				Hipoclorito de sodio (ppm)		
	10	50	75	100	200	400	800
B1	>45	8,3 \pm 0,2	29,0 \pm 0,5	3,7 \pm 0,2	>45	2,5 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1
B2	>45	14,8 \pm 0,2	44,6 \pm 0,4	7,4 \pm 0,3	>45	4,3 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1
FAGK1	>45	11,4 \pm 0,5	41,6 \pm 0,9	5,0 \pm 0,3	>45	2,6 \pm 0,3	1,9 \pm 0,1
FAGK2	>45	14,7 \pm 0,7	>45	7,3 \pm 0,2	>45	4,2 \pm 0,5	1,6 \pm 0,2

T_{99} : Tiempo (min) para lograr la inactivación del 99% de partículas fágicas.

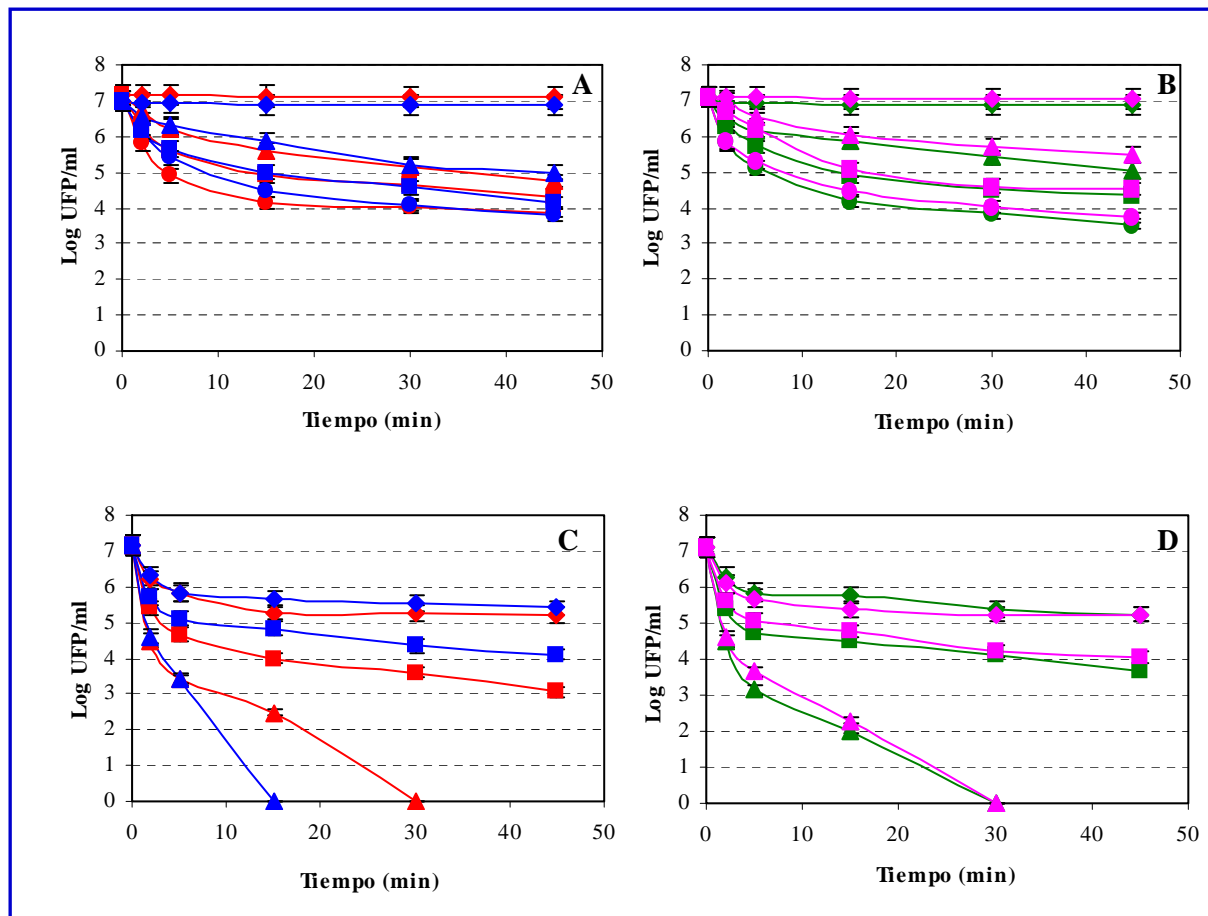


Figura 41. Cinéticas de inactivación química de los fagos B1 (■) y B2 (■), FAGK1 (■) y FAGK2 (■) frente a diferentes concentraciones de etanol (10%, ◆; 50%, ■; 75%, ▲; 100%, ●) (A y B) y de hipoclorito de sodio (200 ppm ◆; 400 ppm, ■; 800 ppm, ▲) (C y D). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2. Inactivación fotoquímica y fotocatalítica

2.1. Inactivación fotoquímica de fagos de *Lactobacillus plantarum*

En la Figura 42 se muestran los resultados de la inactivación fotoquímica de fagos de *Lb. plantarum*. Si bien durante los ensayos no se logró la inactivación completa de las partículas fágicas, se observaron pérdidas de viabilidad comprendidas entre 2,3 (fagos B2, FAGK1 y FAGK2) y 3,2 (fago B1) órdenes logarítmicos.

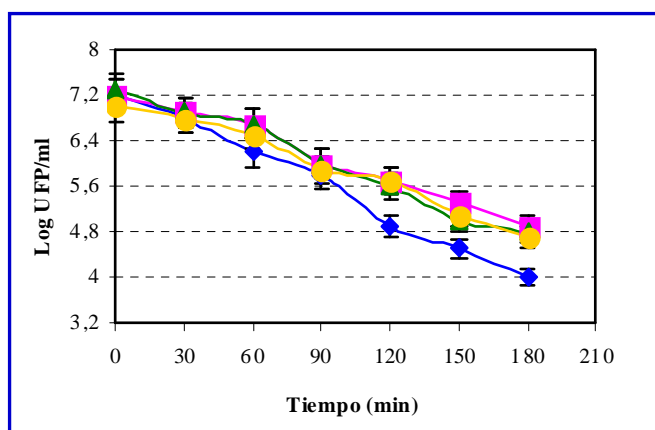
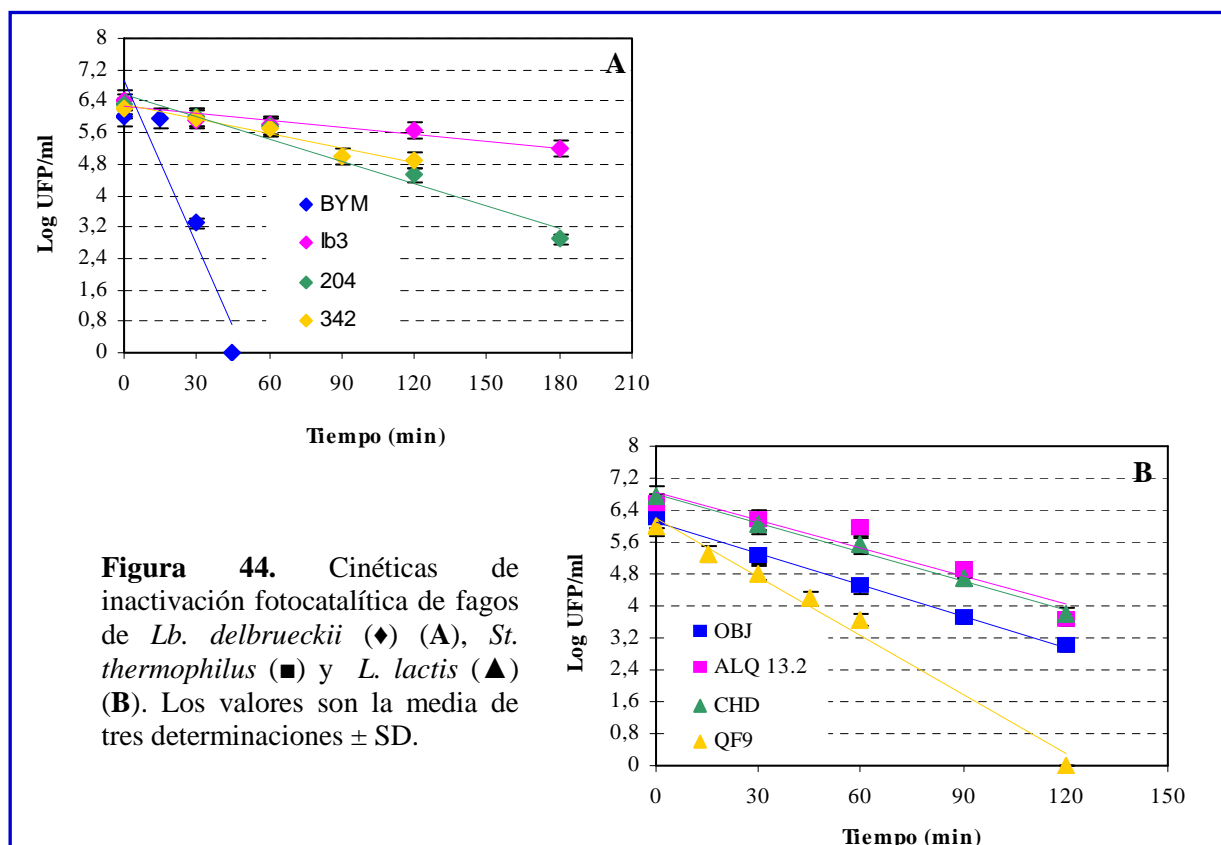
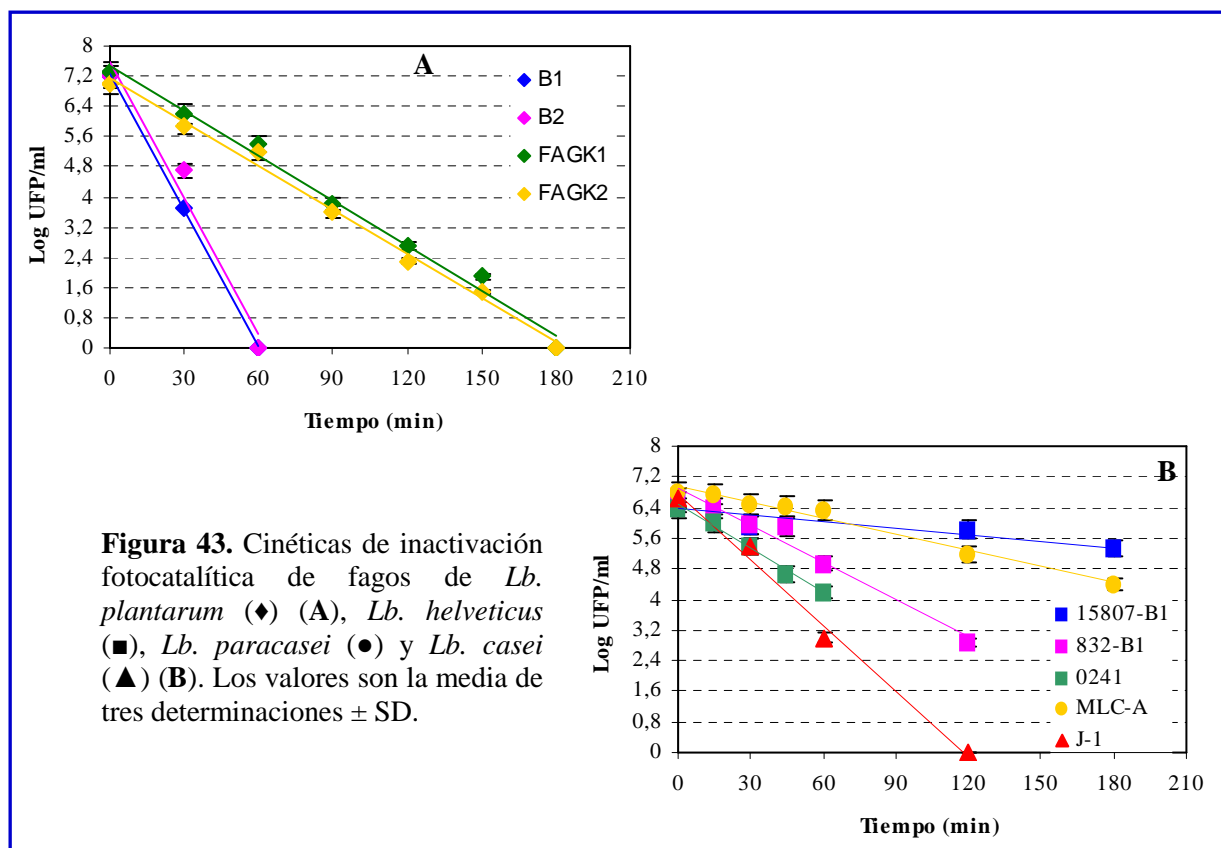


Figura 42. Cinéticas de inactivación fotoquímica de los fagos B1 (♦), B2 (■), FAGK1 (▲) y FAGK2 (●) de *Lb. plantarum*. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2.2. Ensayos de inactivación fotocatalítica de fagos de bacterias lácticas

Los fagos BYM (*St. thermophilus*), B1 y B2 (*Lb. plantarum*) fueron los más sensibles a la fotocatalisis ya que se obtuvieron recuentos no detectables (< 10 UFP/ml) a los 45 (fago BYM) y 60 min (fagos B1 y B2) de tratamiento. Un comportamiento similar fue evidenciado para los fagos J-1 (*Lb. casei*) y QF9 (*L. lactis*), para los cuales se obtuvieron recuentos no detectables luego de 120 min de tratamiento. Contrariamente, los fagos más resistentes fueron 15807-B1 (*Lb. helveticus*) e Ib₃ (*Lb. delbrueckii*) ya que a los 180 min sólo se obtuvieron reducciones de aproximadamente 1,2 órdenes logarítmicos en los títulos fágicos. De manera similar, el fago MLC-A (*Lb. casei*) evidenció resistencia al tratamiento ya que en las mismas condiciones, se observó una caída de los recuentos de 2,4 órdenes logarítmicos (Figuras 43 y 44).

Los resultados experimentales muestran una dependencia lineal entre el logaritmo de la concentración de partículas fágicas (Log UFP/ml) y el tiempo de tratamiento, para los fagos de *Lb. plantarum* (B1, B2, FAGK1 y FAGK2), *Lb. helveticus* (ATCC 15807-B1, 832-B1 y 0241), *Lb. delbrueckii* (204 y 342), *Lb. casei* (J-1), *Lb. paracasei* (MLC-A), *St. thermophilus* (OBJ) y *L. lactis* (CHD y QF9). Para ellos, la velocidad inicial de inactivación fágica puede ser obtenida a través de la pendiente del gráfico Log UFP/ml en función del tiempo (Figuras 43 y 44). Debido a que los fagos BYM (*Lb. delbrueckii*), Ib₃ (*Lb. delbrueckii*) y ALQ 13.2 (*St. thermophilus*) no evidenciaron una dependencia lineal, fueron excluidos de los estudios que siguen a continuación.



En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos para cada fago: la concentración inicial de partículas fágicas $[PFU]_{t=0}$ (PFU/mL), la velocidad volumétrica inicial de inactivación $\left[-\frac{dPFU}{dt}\right]_{t=0}$ ($PFU/mL s$) y el coeficiente de correlación de la regresión lineal (r^2).

Tabla 18. Velocidades volumétricas iniciales de inactivación fotocatalítica para fagos de bacterias lácticas.

Fago	$UFP _{t=0}$ (UFP/mL)	$-\frac{dUFP}{dt} _{t=0}$ ($UFP/mL s$)	r^2 (-)
B1	$1,6 \times 10^7$	$9,21 \times 10^4$	0,9970
B2	$1,6 \times 10^7$	$1,84 \times 10^5$	0,9698
FAGK1	$2,0 \times 10^7$	$4,55 \times 10^4$	0,9901
FAGK2	$1,0 \times 10^7$	$1,49 \times 10^4$	0,9930
15807-B1	$3,5 \times 10^6$	$0,918 \times 10^3$	0,9342
832-B1	$4,5 \times 10^6$	$5,033 \times 10^3$	0,9549
0241	$2,5 \times 10^6$	$3,521 \times 10^3$	0,9874
204	$2,1 \times 10^6$	$1,113 \times 10^3$	0,9512
342	$1,7 \times 10^6$	$0,742 \times 10^3$	0,9409
MLC-A	$6,3 \times 10^6$	$3,073 \times 10^3$	0,9627
J-1	$4,5 \times 10^6$	$9,855 \times 10^3$	0,9621
OBJ	$1,5 \times 10^6$	$1,570 \times 10^3$	0,9968
CHD	$5,5 \times 10^6$	$4,923 \times 10^3$	0,9877
QF9	$9,5 \times 10^6$	$1,433 \times 10^3$	0,9969

2.3. Medida del flujo de energía radiante neta

Para medir el flujo de energía radiante neta, el sensor del radiómetro se colocó orientado hacia el sistema emisor, en 12 posiciones diferentes, dentro del área donde se colocaron las placas cubiertas con el catalizador (Figura 45).

La respuesta de irradiación en el pico (PIR) del radiómetro a una longitud de onda de 350 nm fue de $9,29 \times 10^{-4} A cm^2 W^{-1}$.

El valor medio del flujo de energía radiante neto incidente fue $\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} = 1,78 \times 10^{-3} \text{ W cm}^{-2}$ con una variación estándar de 4%. Si realizamos la conversión de “watts” a fotones por segundo, a una longitud de onda de 350 nm, el valor obtenido es $\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} = 3,136 \times 10^{15} \text{ fotón s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$.

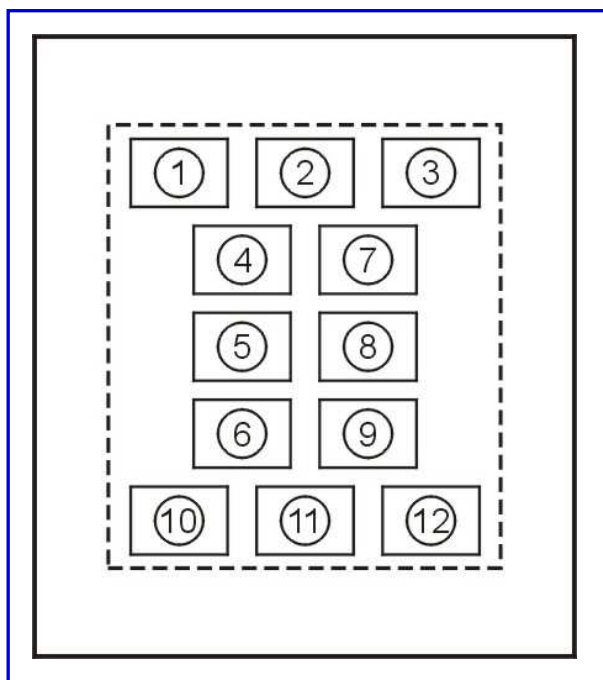


Figura 45. Medición del flujo de energía radiante incidente en diferentes posiciones de la cámara de irradiación ($q_{f,in} \times 10^3 \text{ W cm}^{-2}$): (1) 1,70, (2) 1,77, (3) 1,67, (4) 1,85, (5) 1,86, (6) 1,84, (7) 1,82, (8) 1,86, (9) 1,81, (10) 1,68, (11) 1,81, (12) 1,70.

2.4. Determinación de la velocidad de absorción superficial de fotones (SRPA)

En la Figura 46 se muestran los valores de transmitancia y reflectancia obtenidos para las placas de borosilicato recubiertas o no con el catalizador (TiO_2).

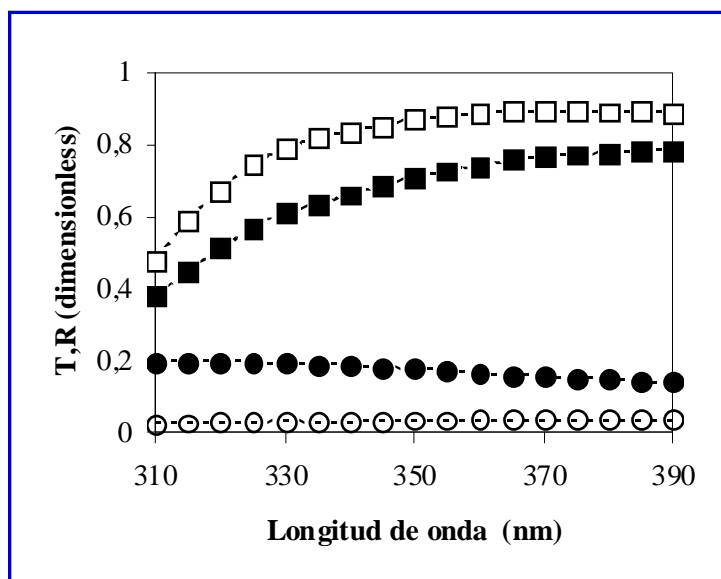


Figura 46. Valores experimentales de transmitancia (■) y reflectancia (●) de placas de borosilicato cubiertas (■, ●) o no (□, ○) con el film de TiO_2 .

Para evaluar la fracción de energía absorbida por el film del catalizador, se pueden utilizar el método de radiación neta o de trazado de rayos, originalmente derivado para múltiples capas paralelas (Siegel y Howell, 2002). En esta técnica se tienen en cuenta los valores de múltiple reflexión, absorción y transmisión de la radiación en las capas.

Las expresiones matemáticas para calcular la fracción de energía incidente transmitida (T_i), reflejada (R_i) y absorbida (α_i), se muestran a continuación (Siegel y Howell, 2002):

$$T_{fg} = \frac{T_f T_g}{1 - R_f R_g} \quad (4)$$

$$R_{fg} = R_f + \frac{R_g T_f^2}{1 - R_f R_g} \quad (5)$$

$$\alpha_{fg} = 1 - T_{fg} - R_{fg} \quad (6)$$

Donde f , g y fg representan las propiedades ópticas del film, vidrio de borosilicato y vidrio de borosilicato con el film de TiO_2 , respectivamente.

Considerando la distribución de emisión espectral de las lámparas utilizadas en este trabajo, las propiedades ópticas se determinaron en el pico de emisión máximo a 350 nm.

De la Figura 46, los valores experimentales de transmitancia y reflectancia para una longitud de onda de 350 nm son:

$$T_{fg,350} = 0,710$$

$$T_{g,350} = 0,871$$

$$R_{fg,350} = 0,179$$

$$R_{g,350} = 0,036$$

Utilizando las ecuaciones 4 a 6 y los datos experimentales obtenidos, los valores para el film de TiO_2 pueden ser calculados a la misma longitud de onda, obteniéndose los siguientes resultados:

$$T_{f,350} = 0,810$$

$$R_{f,350} = 0,155$$

$$\alpha_{f,350} = 0,0352$$

2.5. Evaluación de la eficiencia de inactivación fotocatalítica

Se pueden definir dos eficiencias de inactivación fotocatalítica:

- (i) eficiencia de inactivación fotocatalítica aparente (η_{app})

(ii) eficiencia de inactivación fotocatalítica absorbida (η_{abs})

La eficiencia de inactivación fotocatalítica aparente (η_{app}) es definida como la relación entre la velocidad de inactivación fotocatalítica inicial y la velocidad de energía radiante que recibe la placa de borosilicato recubierta con el catalizador:

$$\eta_{app} = \frac{\left(-\frac{dUFP}{dt} \right) \Big|_{t=0} V_s}{\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} A_{irr}} \quad (7)$$

La velocidad de inactivación fotocatalítica inicial puede ser calculada de la pendiente de las curvas de inactivación mostradas en las Figuras 43 y 44 y en la Tabla 18 (tercera columna) multiplicadas por el volumen de la muestras ($Vm_s = 0,020 \text{ cm}^3$). Por otro lado, la velocidad de energía radiante es obtenida multiplicando el valor medio del flujo de energía neto, evaluado anteriormente, por el área irradiada de la muestra ($A_{irr} = 0,785 \text{ cm}^2$).

En un proceso de inactivación fotocatalítica es importante evaluar no sólo la velocidad de energía de irradiación que llega a la placa sino también la velocidad de energía radiante absorbida por el film de catalizador. De esta manera se obtiene una representación más cercana al fenómeno de inactivación fotocatalítica. La eficiencia de inactivación fotocatalítica absorbida (η_{abs}) puede ser definida como la relación entre la velocidad de inactivación fotocatalítica inicial y la energía radiante absorbida:

$$\eta_{abs} = \frac{\left(-\frac{dUFP}{dt} \right) \Big|_{t=0} V_s}{\langle q_{f,in} \rangle_{A_{irr}} A_{irr} \alpha_f} \quad (8)$$

El denominador en la ecuación 8 puede ser obtenido del flujo de energía radiante neta que llega a las placas con catalizador, el área irradiada de la muestra y la fracción de energía absorbida por el film de catalizador.

En la Tabla 19 se resumen los resultados obtenidos para cada fago: velocidad inicial de inactivación $\left[-\frac{dUFP}{dt} \Big|_{t=0} V_s (UFP/s) \right]$, eficiencia de inactivación fotocatalítica aparente $[\eta_{app}^* (UFP/s.W) \text{ y } \eta_{app} (UFP/fotón)]$ y eficiencia de inactivación fotocatalítica absorbida $[\eta_{abs} (UFP/fotón)]$. Es interesante notar que la eficiencia de inactivación fotocatalítica del proceso,

considerando todos los fagos estudiados, difiere en más de dos órdenes de magnitud. Por ejemplo, la mayor eficiencia de inactivación fue observada para los cuatro fagos de *Lb. plantarum* ($\eta_{abs} = 1,050 \times 10^{-11}$ UFP/foton - $3,437 \times 10^{-12}$ UFP/foton) y para el fago J-1 (*Lb. casei*) ($\eta_{abs} = 2,273 \times 10^{-12}$ UFP/foton). Contrariamente, la menor eficiencia fue observada para los fagos 342 y 204 (*Lb. delbrueckii*) ($\eta_{abs} = 0,171 \times 10^{-12}$ UFP/foton y $0,257 \times 10^{-12}$ UFP/foton) así como también para el fago 15807-B1 (*Lb. helveticus*) ($\eta_{abs} = 0,212 \times 10^{-12}$ UFP/foton). Adicionalmente, los resultados muestran que fagos que comparten la misma cepa hospedadora y similares características morfológicas (832-B1 y 0241, CHD y QF9, FAGK1 y FAGK2) evidenciaron un comportamiento distinto frente a la inactivación fotocatalítica, lo cual puede deberse a una diferente estabilidad de los componentes proteicos.

Tabla 19. Eficiencias de inactivación fotocatalítica para fagos de bacterias lácticas.

Bacteriofago	$-\left. \frac{dUFP}{dt} \right _{t=0} V_s$ (UFP/s)	η_{app}^* (UFP/s.W)	η_{app} (UFP/foton)	η_{abs} (UFP/foton)
B1	$1,842 \times 10^3$	$1,318 \times 10^6$	$7,482 \times 10^{-13}$	$2,125 \times 10^{-11}$
B2	$3,680 \times 10^3$	$2,633 \times 10^6$	$1,494 \times 10^{-12}$	$4,244 \times 10^{-11}$
FAGK1	$0,910 \times 10^3$	$6,512 \times 10^5$	$3,696 \times 10^{-13}$	$1,050 \times 10^{-11}$
FAGK2	$0,298 \times 10^3$	$2,132 \times 10^5$	$1,210 \times 10^{-13}$	$3,437 \times 10^{-12}$
15807-B1	$0,184 \times 10^2$	$0,132 \times 10^5$	$0,745 \times 10^{-14}$	$0,212 \times 10^{-12}$
832-B1	$1,006 \times 10^2$	$0,720 \times 10^5$	$4,086 \times 10^{-14}$	$1,161 \times 10^{-12}$
0241	$0,704 \times 10^2$	$0,504 \times 10^5$	$2,858 \times 10^{-14}$	$0,812 \times 10^{-12}$
204	$0,223 \times 10^2$	$0,159 \times 10^5$	$0,904 \times 10^{-14}$	$0,257 \times 10^{-12}$
342	$0,148 \times 10^2$	$0,106 \times 10^5$	$0,603 \times 10^{-14}$	$0,171 \times 10^{-12}$
MLC-A	$0,615 \times 10^2$	$0,440 \times 10^5$	$2,495 \times 10^{-14}$	$0,709 \times 10^{-12}$
J-1	$1,971 \times 10^2$	$1,410 \times 10^5$	$8,001 \times 10^{-14}$	$2,273 \times 10^{-12}$
OBJ	$0,314 \times 10^2$	$0,225 \times 10^5$	$1,275 \times 10^{-14}$	$0,362 \times 10^{-12}$
CHD	$0,985 \times 10^2$	$0,705 \times 10^5$	$3,996 \times 10^{-14}$	$1,135 \times 10^{-12}$
QF9	$0,287 \times 10^2$	$0,205 \times 10^5$	$1,163 \times 10^{-14}$	$0,330 \times 10^{-12}$

$\left[-\left. \frac{dUFP}{dt} \right|_{t=0} V_s \right]$: velocidad inicial de inactivación.

η_{app}^* y η_{app} : eficiencia de inactivación fotocatalítica aparente.

η_{abs} : eficiencia de inactivación fotocatalítica absorbida.

3. Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas de *Lactobacillus plantarum*

En general, el método en MA fue más eficiente que el método de CS para el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes.

Con la metodología de CS, y a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014, fue posible obtener 46 mutantes presuntivos usando el fago B1, 30 utilizando el fago B2 y 37 cuando se emplearon cócteles de los dos fagos. Mientras que con la técnica en MA, se aislaron 18 mutantes usando el fago B1 y 20 usando los dos fagos simultáneamente aunque no fue posible aislar variantes fagorresistentes usando el fago B2. En total, con las dos técnicas, se obtuvieron 151 mutantes presuntivos a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014 (Tabla 20).

Cuando fue utilizada la cepa *Lb. plantarum* PLN, fue posible el aislamiento de 12 mutantes presuntivos.

4. Caracterización del fenotipo fagorresistencia

4.1. Confirmación de la fagorresistencia y eficiencia en la recuperación de mutantes

Todos los mutantes presuntivos aislados fueron sometidos al test de turbidez para confirmar su fagorresistencia. Aquellos clones aislados cuyo fenotipo fagorresistencia se mantuvo en el tiempo, fueron considerados verdaderos mutantes espontáneos fagorresistentes. Por el contrario, aquellos que perdieron el fenotipo a lo largo de las experiencias confirmatorias, se consideraron falsos mutantes fagorresistentes y se descartaron.

Si bien en algunos casos no fue posible el aislamiento de mutantes fagorresistentes mediante la técnica en MA, con esta metodología se observó una mayor recuperación de mutantes fagorresistentes confirmados (Tabla 20).

De un total de 151 mutantes presuntivos obtenidos a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014, solo 74 (49%) fueron confirmados como tales. Entre ellos, 47 (63%) fueron aislados utilizando el fago B1 (44 mutantes) o el fago B2 (3 mutantes) y 27 (37%) utilizando cócteles de fagos. Entre los 27 mutantes obtenidos bajo presión de ambos fagos, sólo 6 (obtenidos a partir de la metodología de CS) mostraron resistencia a ambos fagos. El mutante restante obtenido con la misma técnica fue resistente sólo al fago B2 mientras que los 20 mutantes obtenidos con la metodología en MA fueron resistentes sólo al fago B1.

De los 12 mutantes presuntivos obtenidos con *Lb. plantarum* PLN, 7 (58%) fueron confirmados como tales.

Tabla 20. Mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos a partir de cepas fago sensibles de *Lb. plantarum*, mediante cultivos secundarios (CS) y en medio agarizado (MA).

Cepa sensible	Fago lítico	N° de mutantes fagorresistentes				Eficiencia de recuperación de mutantes confirmados (%)	
		Presuntivos		Confirmados		CS	MA
		CS	MA	CS	MA		
ATCC 8014	B1	46	18	30	14	65	77
	B2	30	-	3	-	10	-
	B1+B2	37	20	7 ^a	20 ^b	18	100
PLN	B2	12	-	7	-	58	-

a: 1 de ellos fue solamente resistente al fago B2.; b: solamente resistentes al fago B1.

4.2. Estabilidad de la fagorresistencia

La estabilidad de los mutantes aislados a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014 fue variable. Las variantes obtenidas bajo presión de los dos fagos mostraron elevada estabilidad ya que al menos el 62% de ellos sobrevivió al séptimo repique (Tabla 21). Entre ellos, tres variantes resistentes a ambos fagos fueron capaces de resistir hasta el séptimo repique.

Se observaron menores niveles de estabilidad de la fago resistencia para los mutantes aislados usando el fago B1, ya que sólo el 40% de ellos fue estable hasta el séptimo repique, mostrando de todas maneras una elevada resistencia del fenotipo.

Considerando las variantes aisladas bajo presión del fago B2, la estabilidad fue considerablemente más baja ya que la totalidad de ellos perdieron el fenotipo al cuarto repique. Igual comportamiento fue observado para todos los mutantes aislados de *Lb. plantarum* PLN.

Tabla 21. Estabilidad del fenotipo fagorresistencia en los mutantes aislados a partir de cepas de *Lb. plantarum* (% de mutantes que resistieron sucesivos repiques en presencia de fagos, sin perder el fenotipo).

Cepa	Fago	Número de repiques							
		1	2	3	4	5	6	7	
ATCC 8014	B1	100	100	95	81	65	54	40	
	B2	100	100	33	0				
	B1+B2	B1	100	96	88	85	81	66	62
		B2	85	85	71	71	71	71	71
PLN	B2	100	100	100	0				

4.3. Nivel de fagorresistencia (EOP, Efficiency of Plaquing)

Cuando los fagos B1 y B2, en altas concentraciones, fueron ensayados sobre los mutantes previamente aislados, fueron demostrados diversos niveles de resistencia (Tabla 22). De los 44 mutantes de *Lb. plantarum* ATCC 8014 aislados bajo presión del fago B1, 18 presentaron valores de EOP de entre 10^{-10} a 10^{-7} (nivel de fagorresistencia alto) y 19 mostraron valores de EOP $<10^{-10}$ (niveles de fagorresistencia extremadamente altos) mientras que 7 variantes evidenciaron niveles intermedios de fagorresistencia. De manera similar, las variantes aisladas de la misma cepa, pero bajo presión del fago B2, y la mayoría de los mutantes obtenidos utilizando cócteles de fagos fueron extremadamente resistentes (EOP $<10^{-10}$) a ambos fagos. El mismo comportamiento fue exhibido por la mayoría de las variantes obtenidas de *Lb. plantarum* PLN, cuyos valores de EOP fueron $<10^{-10}$.

Tabla 22. Nivel de resistencia fágica (EOP) de los mutantes fagorresistentes de *Lb. plantarum*.

Cepa	Fago	EOP (N° de mutantes dentro de cada rango)			
		10^{-1} - 10^{-3}	10^{-4} - 10^{-6}	10^{-7} - 10^{-10}	$<10^{-10}$
ATCC 8014	B1	0	7	18	19
	B2	0	0	0	3
	B1	0	0	8	19
	B1+B2	0	1	0	6
PLN	B2	0	1	0	6

4.4. Lisogenia

4.4.1. Liberación espontánea de partículas fágicas

La presencia de fagos libres en los sobrenadantes fue detectada para 5 mutantes obtenidos a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014 bajo presión del fago B1, un mutante obtenido usando cócteles de fagos y uno aislado a partir de *Lb. plantarum* PLN. Sin embargo, este fenómeno no fue repetitivo.

4.4.2. Inducción de profagos con mitomicina C

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el experimento anterior, se estudió la presencia de profagos inducibles con mitomicina C en *Lb. plantarum* ATCC 8014 y en una de sus variantes fagorresistentes (obtenida bajo presión de ambos fagos y para la cual

en algunos experimentos se observó liberación espontánea de partículas virales). Luego de 6 hs de incubación se observó una disminución en la densidad óptica de ambos cultivos en presencia de 0,6 y 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C (Figura 47). Estos resultados son compatibles con la presencia de profagos inducibles por mitomicina C en ambas cepas.

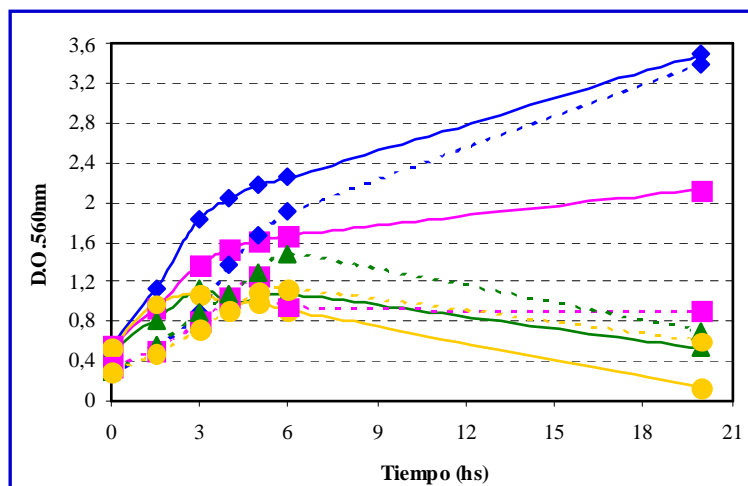


Figura 47. Inducción de profagos de *Lb. plantarum* ATCC 8014 (—) y su variante fagorresistente (-----) (obtenida bajo presión del cóctel de fagos), usando 0 (♦), 0,4 (■), 0,6 (▲) o 0,8 (●) $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C.

Los cultivos lisados (provenientes del tubo con 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C), fueron filtrados y los fagos fueron ensayados en cuanto a su capacidad para infectar cepas de *Lb. plantarum*. Las cepas ensayadas fueron: ATCC 8014, WCSF1, PLN, LMG9211, el mutante fagorresistente utilizado en la experiencia de inducción y una variante fagorresistente obtenida bajo presión del fago B1. Sin embargo, los fagos temperados presuntamente liberados no fueron capaces de infectar ninguna de las 6 cepas ensayadas. Estos resultados no serían indicativos de la ausencia de fagos temperados, ya que en la mayoría de los casos es difícil encontrar una cepa indicadora. Para confirmar la presencia de fagos, podría realizarse la extracción de ADN fágico o bien observaciones al microscopio electrónico (Mercanti y col., 2011).

4.5. Tasas de adsorción fágica

La mayoría de los mutantes (86%) de *Lb. plantarum* ATCC 8014 obtenidos usando el fago B1 fueron completamente o parcialmente incapaces de unir partículas fágicas, ya que se evidenciaron tasas de adsorción comprendidas entre 0-30% (66% de las variantes) o 31-70% (20% de las variantes). Similar comportamiento fue exhibido para los mutantes aislados bajo presión del fago B2, ya que la mayoría de ellos (67% de los mutantes) presentaron bajas tasas de adsorción (entre 0 y 30%). Por su parte, 48% de las variantes obtenidas bajo presión del cóctel fágico exhibieron tasas de adsorción bajas (0-30%), mientras que los mutantes restantes unieron altas concentraciones de fagos (31-100 % de adsorción) (Figura 48).

Considerando las variantes de *Lb. plantarum* PLN, 86% de ellas presentaron tasas de adsorción medias (31-70%).

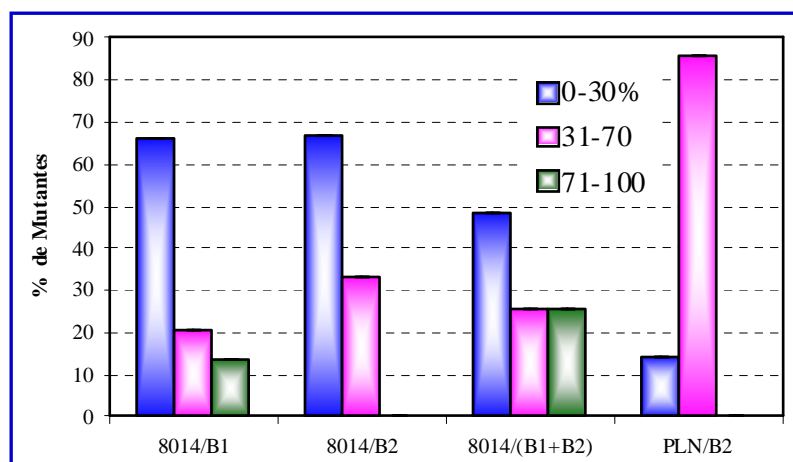


Figura 48. Distribución porcentual de las tasas de adsorción (% de partículas fágicas adsorbidas a 37°C - 30 min) exhibidas por los mutantes espontáneos fagorresistentes aislados a partir de cepas de *Lb. plantarum*.

5. Caracterización de los mutantes fagorresistentes

Para llevar a cabo los siguientes estudios, se seleccionaron 10 mutantes fagorresistentes (todos aislados a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014) en base a los resultados obtenidos en la caracterización de su fenotipo fagorresistencia (estabilidad y niveles de resistencia altos y baja o nula adsorción fágica). De las 10 variantes fagorresistentes, 4 de ellas fueron aisladas bajo presión del fago B1 y las 6 restantes utilizando cócteles de fagos (Tabla 23).

Tabla 23. Mutantes fagorresistentes de *Lb. plantarum* ATCC 8014 seleccionados para llevar a cabo la caracterización.

Mutante	Fago/s usado/s para su aislamiento
M1	B1
M2	
M3	
M4	
MC1	B1+B2
MC2	
MC3	
MC4	
MC5	
MC6	

5.1. Morfología

Las colonias de los mutantes fagorresistentes de *Lb. plantarum* ATCC 8014 presentaron aspecto similar al de su cepa madre. De igual manera, la morfología celular observada al microscopio óptico fue coincidente con la de la cepa sensible (Figura 49).

Las colonias obtenidas en agar MRS fueron cremosas con bordes regulares y de color beige. Al microscopio óptico, se revelaron como bacilos rectos, pequeños, en cadenas cortas o de a dos.

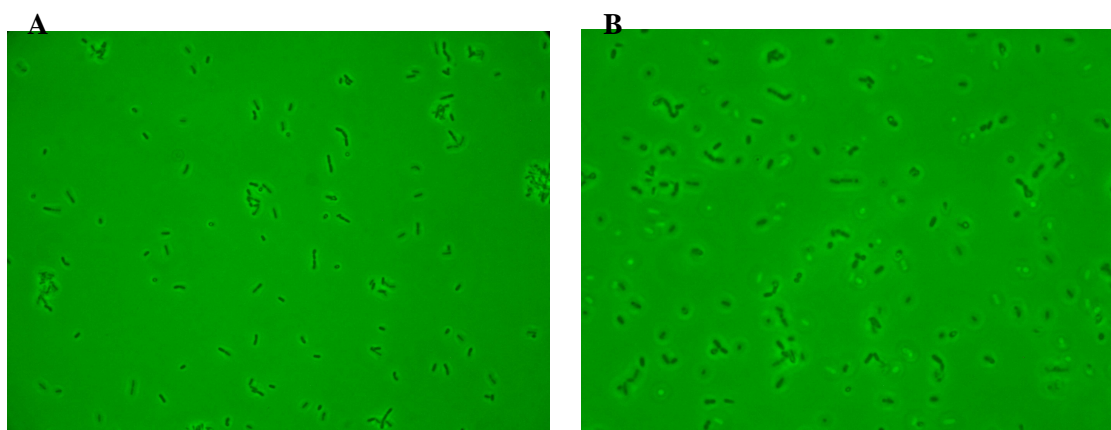


Figura 49. Morfología celular de la cepa fago-sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 (A) y de su mutante fagorresistente MC4, obtenido bajo presión de cócteles de fagos (B). Fotografías obtenidas por observación en microscopio óptico de contraste de fases (1000x).

5.2. Espectro de hospedadores de los mutantes fagorresistentes

Los mutantes obtenidos a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014 bajo presión del fago B1 no presentaron resistencia cruzada respecto al fago B2 (Tabla 24).

Tabla 24. Espectro de hospedadores de mutantes fagorresistentes de *Lb. plantarum* ATCC 8014, obtenidos bajo presión del fago B1.

Mutante	Fago B2
M1	+
M2	+
M3	+
M4	+(3°)

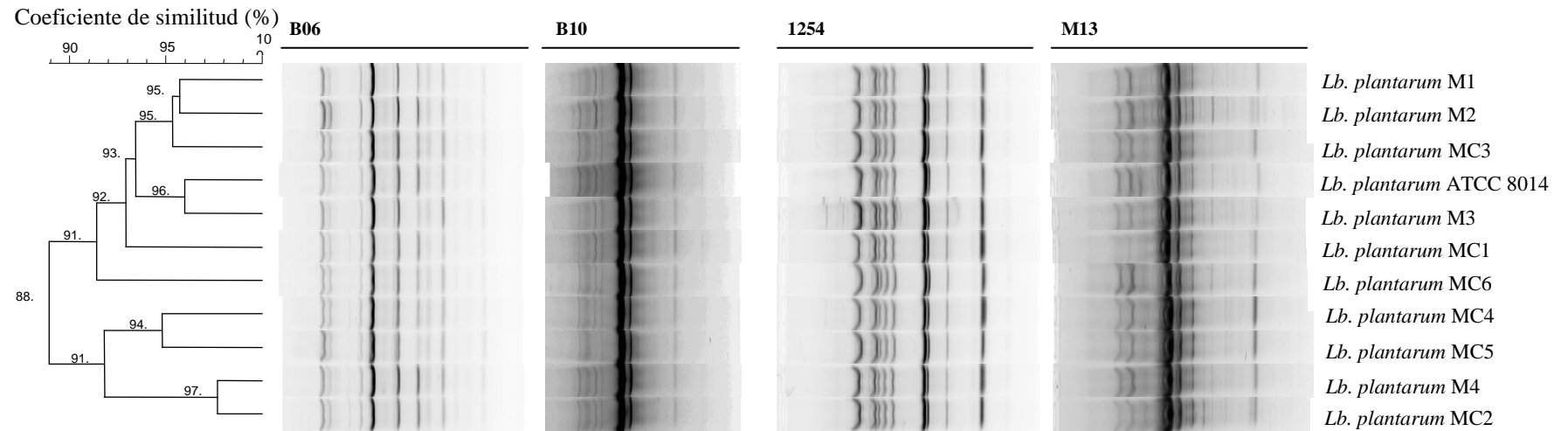
+ sensible.

5.3. Estudios genéticos

5.3.1. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction)

El dendrograma obtenido con los 4 primers usados (B06, B10, 1254 y M13) mostró elevada homología (mayor al 88%) entre la cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 y sus mutantes fagorresistentes (Figura 50). Estos resultados demuestran que no se produjeron cambios genéticos significativos durante la obtención de las variantes fagorresistentes, a la vez que descartan la posibilidad de contaminaciones durante el proceso de aislamiento.

Figura 50. Dendrograma obtenido por comparación (BioNumerics™ V 3.0, Applied MathsBVBA, Bélgica) y reagrupamiento (UPGMA: Unweighted Pair Group Method with ArithmeticAverages) de los perfiles RAPD-PCR de *Lb. plantarum* ATCC 8014 y sus mutantes fagorresistentes, usando los primers B06, B10, 1254 y M13.



5.4. Caracterización tecnológica

5.4.1. Selección de un medio de cultivo para desarrollo de los mutantes fagorresistentes

Los mutantes fagorresistentes alcanzaron valores de pH inferiores a 4,55 a las 24 hs de incubación en LDR (Tabla 25). En las mismas condiciones, la cepa fago sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 evidenció un valor de pH de 4,20.

Cuando los mutantes así como también la cepa sensible fueron inoculados en LDR-HC, sólo fueron capaces de coagular el medio de cultivo, en el primer repique. Luego de un segundo repique en LDR-HC, partiendo del primero en el mismo medio, no fueron capaces de coagularlo. Este comportamiento podría deberse a que cuando es realizado el primer repique, las cepas tendrían la capacidad de coagular el medio LDR-HC debido a los nutrientes provenientes del caldo MRS, los cuales le permitirían llevar a cabo una acidificación adecuada. Sin embargo, cuando es realizado el segundo repique no dispondrían de dichos nutrientes. Por lo tanto el uso de LDR-HC como medio de crecimiento para llevar a cabo estudios posteriores, fue descartado.

Tabla 25. Valores de pH obtenidos por desarrollo de mutantes fagorresistentes de *Lb. plantarum* (24 horas a 37°C) en LDR.

Mutante	M1	M2	M3	M4	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6
pH	4,16	4,20	4,15	4,18	4,55	4,06	4,15	4,42	4,37	4,41

5.4.2. Desarrollo de los mutantes fagorresistentes en medios de base láctea

En lugar de LDR, fue utilizado el medio EM-glucosa, el cual fue empleado para el estudio de la resistencia térmica de fagos y que es utilizado en la industria láctea fermentativa para la propagación de bacterias probióticas.

Las cinéticas de acidificación de los mutantes en el medio EM-glucosa se muestran en la Figura 51. Como puede observarse todos los mutantes presentaron similar comportamiento, alcanzando valores de pH cercanos a 4,5 a las 4 hs (mutantes obtenidos bajo presión del fago B1) o 6 hs (mutantes obtenidos bajo presión de los dos fagos) de incubación.

A las 24 hs, los valores de pH estuvieron comprendidos entre 3,54 y 3,84 mientras que la acidez osciló entre 97°D y 131°D (Tabla 26). Estos valores fueron semejantes a los alcanzados por la cepa fago sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 (pH 3,5 y acidez 131,2°D).

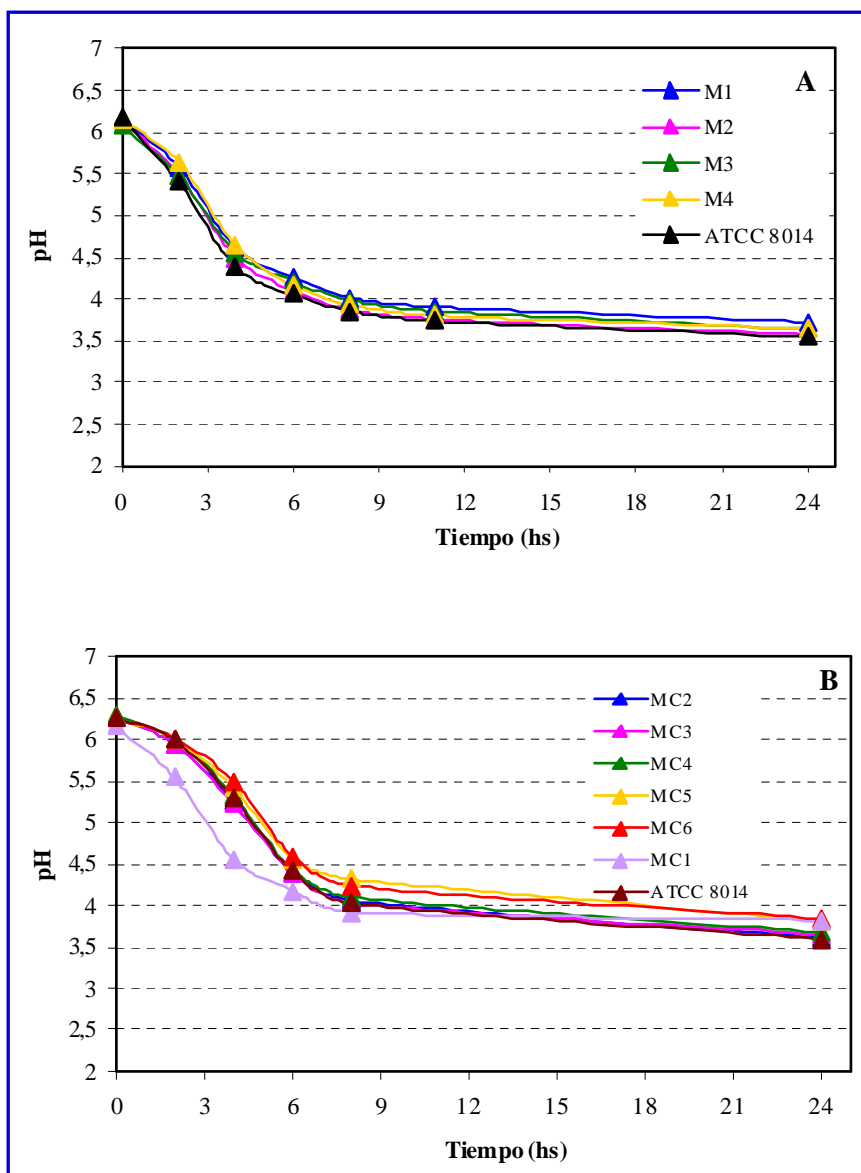


Figura 51. Cinéticas de acidificación en el medio EM-glucosa (37°C) de los mutantes fagorresistentes de *Lb. plantarum* obtenidos bajo presión del fago B1(A) o del cóctel fágico (B1+B2) (B).

Tabla 26. Actividad acidificante de los mutantes fagorresistentes de *Lb. plantarum*, luego de 24 hs a 37°C en el medio EM-glucosa.

Mutante	M1	M2	M3	M4	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6
Acidez (°D)	114,4	132,3	121,8	130,2	128,1	122,8	131,2	120,7	106,0	97,6

5.4.3. Empleo de mutantes fagorresistentes en una minielaboración de leche fermentada

La variante fagorresistente MC4, obtenida bajo presión del cóctel fágico (B1+B2), fue seleccionada para llevar a cabo este estudio. Además, se incluyó en el experimento a la cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014.

Se investigó la capacidad del mutante MC4 para resistir la infección fágica durante la elaboración de leche fermentada. En la Figura 52 se muestran la evolución del pH, recuentos celulares y títulos fágicos durante el proceso de elaboración.

Lb. plantarum ATCC 8014 y su variante MC4 fueron capaces de crecer en el medio EM-glucosa hasta alcanzar recuentos de 10^9 UFC/ml y producir descensos del pH a valores de 4,5 a las 7,5 hs de incubación (Figura 52A). Sin embargo, en presencia del cóctel de fagos, los recuentos celulares fueron reducidos drásticamente para la cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014, siendo detectados recuentos de 10^5 UFC/ml y valores de pH de 6,1 a las 7,5 hs de incubación (Figura 52A). Los títulos del cóctel de fagos se incrementaron durante el mismo período de tiempo alcanzando valores de 10^9 UFP/ml (Figura 52B). En contraste, un continuo crecimiento bacteriano fue exhibido por la variante fagorresistente MC4 en presencia del cóctel de fagos, observándose recuentos celulares de 10^9 UFC/ml y títulos fágicos de 10^4 UFP/ml a las 7,5 hs de incubación.

Viabilidad celular y fágica durante el almacenamiento refrigerado

La viabilidad de la cepa resistente MC4 fue mantenida en 10^9 UFC/ml hasta el final del período de almacenamiento refrigerado (21 días). Con respecto a los valores de pH de la leche fermentada, se evidenció una disminución a un valor de 3,9 durante los primeros 7 días de almacenamiento. Luego de este período el pH se mantuvo constante. Para la cepa sensible en presencia del cóctel de fagos, los recuentos celulares fueron de 10^5 UFC/ml mientras que el pH descendió a 4,6 luego de los 7 días para posteriormente mantenerse en ese valor (Figura 52C). Las partículas fágicas componentes del cóctel fueron incapaces de propagarse en presencia de la variante fagorresistente durante el almacenamiento refrigerado (Figura 52D).

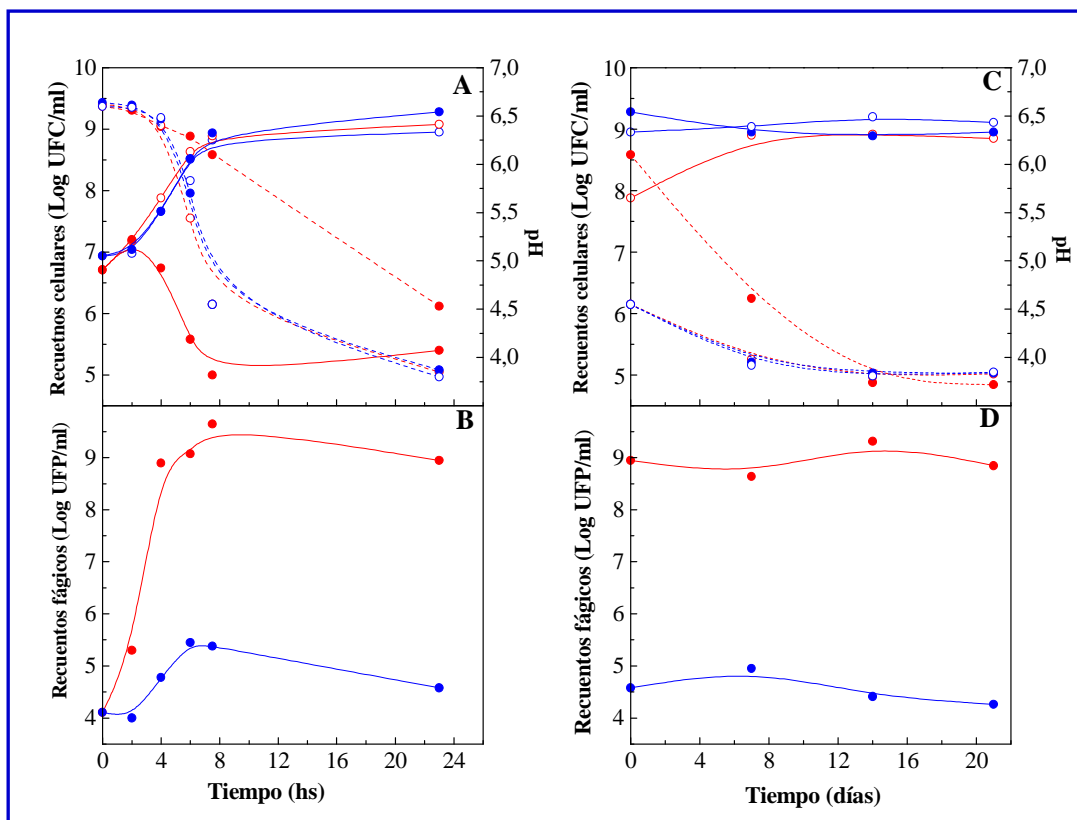
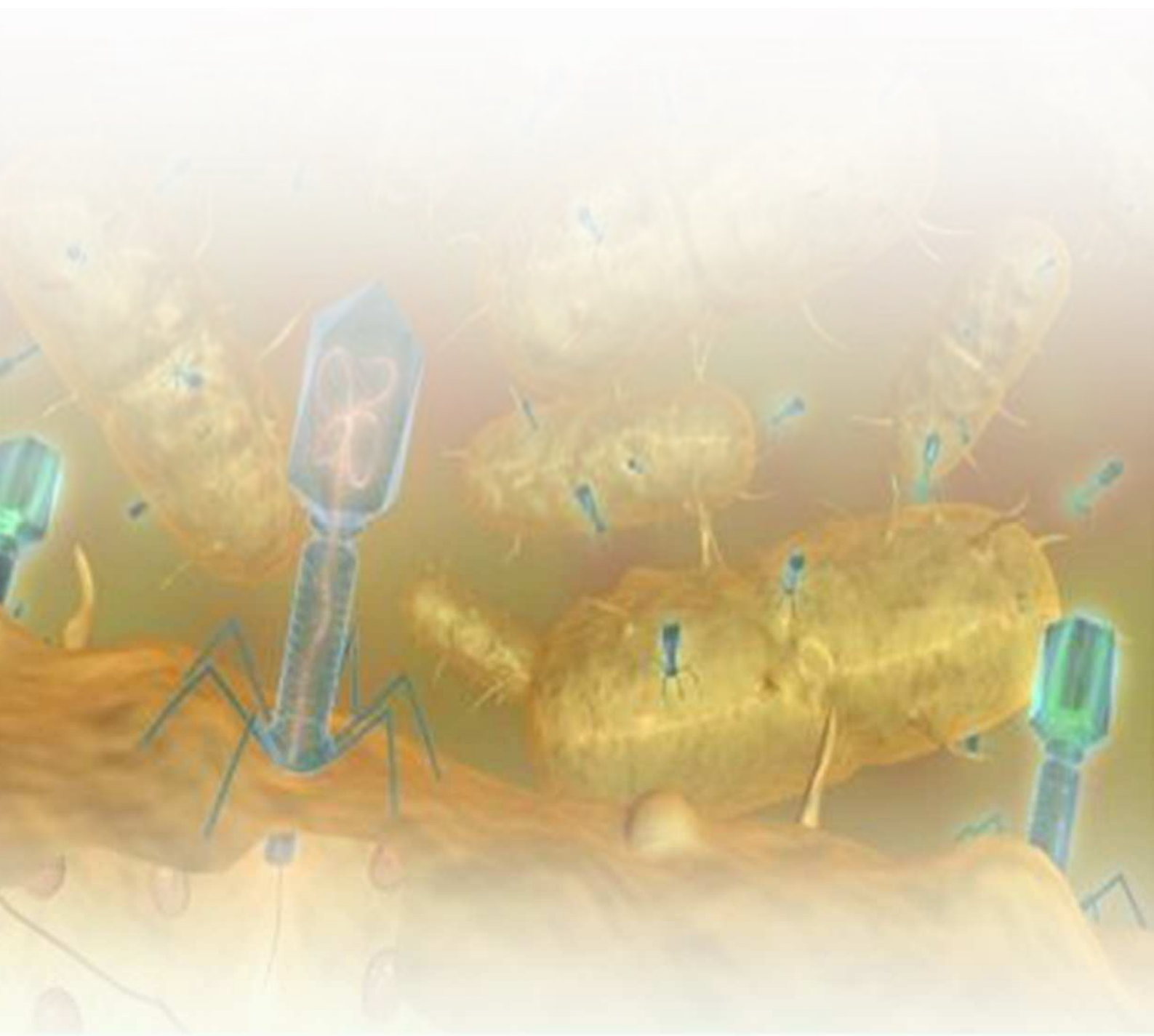


Figura 52. Evolución de los recuentos celulares (—) y valores de pH (----) durante la fermentación del medio EM-glucosa (A) y posterior almacenamiento refrigerado del producto (C) usando *Lb. plantarum* ATCC 8014 (—) o su mutante fagorresistente MC4 (—), infectado (●) o no (○) con un cóctel fagos (B1+ B2). Títulos de los fagos B1+B2 durante la fermentación (B) y el posterior almacenamiento refrigerado (D) del medio EM-glucosa usando *Lb. plantarum* ATCC 8014 (—) o su mutante fagorresistente MC4 (—).

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Una de las estrategias disponibles para mantener la concentración de partículas fágicas por debajo de los niveles críticos es la aplicación de tratamientos térmicos y químicos. Si bien estos estudios han sido realizados para fagos de otras especies bacterianas obteniendo diversidad en los resultados, la información referida a fagos de *Lb. plantarum* es escasa. Como consecuencia de ello, se estudió el comportamiento de los fagos B1, B2, FAGK1 y FAGK2 frente a tratamientos térmicos, en diferentes medios de suspensión, así como también frente a tratamientos con diversos biocidas.

Los fagos de *Lb. plantarum* estudiados en esta Tesis, mostraron una elevada resistencia a 63°C y 72°C, no siendo posible la inactivación completa de las partículas fágicas en estas condiciones dentro de los 45 min de tratamiento. Esto sugiere que los tratamientos de pasteurización LTLT (*Low Temperature Long time*) (63°C por 30 min) y HTST (72°C por 15 seg) que se aplican sobre la materia prima utilizada en la elaboración de quesos no son suficientes para lograr la inactivación de las partículas fágicas que pudieran estar presentes en la leche. Como consecuencia, elevadas concentraciones de fagos permanecerían en la leche, generando problemas durante el proceso de fermentación y ausencia de características deseables en el producto final. En general, los fagos de otras especies bacterianas tradicionalmente utilizadas en la industria láctea mostraron el mismo comportamiento (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003; Capra y col., 2004; Buzrul y col., 2007; Atamer y col., 2011; Mercanti y col., 2012). En contraste, dos fagos temperados (con cabeza prolata) de *Lb. delbrueckii* fueron sensibles a tratamientos térmicos de 63°C y 72°C (Ebrecht y col., 2010).

Analizando el comportamiento de otros fagos de *Lb. plantarum*, se puede observar que los fagos estudiados en esta Tesis mostraron mayor resistencia a la temperatura. El fago JL-1 fue rápidamente inactivado a temperaturas por encima de 70°C, obteniéndose tiempos de reducción decimal (D) de 2,7 min y 0,2 min (a 70°C y 80°C, respectivamente) (Lu y col., 2003a). En tanto, para el fago fri se obtuvo la completa inactivación de las partículas fágicas luego de 10 min a 60°C o 5 min a 70°C (Trevors y col., 1983). También fue observada una mayor resistencia térmica de los fagos B1, B2, FAGK1 y FAGK2 en comparación a los resultados reportados para fagos de otras bacterias lácticas mesófilas como *Lb. casei* y *Lb. paracasei*. Los fagos de estas especies bacterianas fueron inactivados a 72°C dentro de los 15 min de tratamiento (Capra y col., 2004).

La completa inactivación de los fagos estudiados en esta Tesis fue lograda solamente luego de aplicar calentamientos a 90°C durante 5 min. Sin embargo, este tratamiento térmico podría ser aplicado a la materia prima destinada a la elaboración de leches fermentadas pero no a la leche utilizada para la producción de quesos, debido a que en estas condiciones se produciría la desnaturalización de las proteínas del suero, lo cual dificultaría el proceso de elaboración. Resultados similares fueron reportados para fagos de otras especies bacterianas (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003; Capra y col., 2004; Buzrul y col., 2007; Mercanti y col., 2012). Sin embargo, el fago Ib₃ (*Lb. delbrueckii*) (Quiberoni y col., 2003) y algunos fagos de *Lactococcus* evidenciaron elevada termorresistencia, tolerando, en algunos casos, tratamientos a 97°C durante 5 min (Buzrul y col., 2007; Atamer y col., 2009).

Los protocolos utilizados para la detección de fagos en muestras lácteas incluyen un tratamiento térmico de la muestra a 90°C durante 15 min para lograr la inactivación fágica y así poder diferenciar si la inhibición de la/s cepa/s es debida a la presencia de fagos o de otros agentes inhibidores. Teniendo en cuenta la elevada termorresistencia evidenciada por algunos fagos, estos protocolos podrían no ser siempre eficaces para distinguir entre fagos con alta termorresistencia y agentes inhibidores de naturaleza química (Atamer y col., 2009).

Si bien el medio de suspensión, en general, no afectó la resistencia térmica de los fagos de *Lb. plantarum* estudiados en esta Tesis, se observó un leve incremento de la termorresistencia en presencia de LDR o EM-glucosa para los fagos B2, FAGK1 y FAGK2. Por lo tanto, el medio de suspensión usado en la industria podría tener un efecto protector sobre los fagos de *Lb. plantarum*. El mismo comportamiento en LDR fue evidenciado para fagos de lactococos (Daoust y col., 1965; Fabrizio y col., 1999; Suárez y Reinheimer, 2002; Müller-Merbach y col., 2005), *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2003; Ebrecht y col., 2010) y *Leuconostoc* (Atamer y col., 2011). Algunos autores sugieren que sería la materia grasa de la leche la que otorgaría el efecto protector (Fabrizio y col. 1999). Si bien, otros componentes de la leche como fosfato, proteínas del suero (Daoust y col., 1965) y caseína (Atamer y col., 2010) podrían ejercer un efecto protector de los fagos durante la aplicación de tratamientos térmicos.

Durante la elaboración de quesos y con el objetivo de aumentar la concentración de sólidos, suelen incorporarse a la leche algunos residuos de elaboraciones anteriores, como por ejemplo, concentrado de proteínas o materia grasa que previamente fueron separados de los sueros. Sin embargo, el empleo de estos concentrados podría recontaminar la materia prima con partículas fágicas ya que se observó un incremento de la termorresistencia fágica al

aumentar la proporción de proteínas de suero y materia grasa en los concentrados (Atamer y col., 2010).

Durante su calentamiento, la leche puede sufrir algunas modificaciones que podrían incrementar la estabilidad de las partículas fágicas, entre ellas el aumento de su capacidad buffer. Con tratamientos por debajo de 100°C durante 10 minutos, la capacidad buffer de la leche a pH 5, se incrementa. Esto podría actuar como una barrera protectora de los fagos durante el proceso de fermentación ya que dificultaría el descenso rápido del pH y por lo tanto la pérdida de viabilidad fágica (Salaün y col., 2005). En contraste, durante el calentamiento de la leche se produce la insolubilización del fosfato de calcio lo cual podría incrementar la sensibilidad de los fagos (Salaün y col., 2005). Esto puede deberse a que los cationes Ca^{2+} producen cambios conformacionales en las proteínas estructurales de los fagos, las cuales son esenciales para la formación de procápsides estables (Huet y col., 2010) así como también cambios en la proteína de unión del receptor fágico durante la adsorción (Sciara y col., 2010).

Con respecto al tratamiento con agentes químicos comúnmente utilizados como biocidas en ambientes industriales y laboratorios, se observó que el ácido peracético fue el más eficiente. Este biocida logró la completa inactivación de los fagos de *Lb. plantarum* en corto tiempo, siendo también efectivo para fagos de otras especies de bacterias lácticas (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003; Capra y col., 2004; Ebrecht y col., 2010; Mercanti y col., 2012).

Con respecto a los tratamientos con alcoholes, el etanol no fue muy efectivo en la inactivación de fagos ya que aún luego de 45 min de contacto, se encontraron altos recuentos de partículas fágicas. En contraste, Trevors y col., (1983) reportaron una elevada sensibilidad del fago fri a soluciones de etanol al 25%. De manera similar a los resultados obtenidos en esta Tesis, una elevada resistencia al etanol fue observada para fagos de otras bacterias lácticas como *Lb. casei* y *Lb. paracasei* (Capra y col., 2004; Mercanti y col., 2012) mientras que los fagos de *St. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2003; Ebrecht y col., 2010), *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999) y *L. lactis* (Suárez y Reinheimer, 2002; Buzrul y col., 2007) fueron más sensibles a este agente químico.

El etanol podría ser usado conjuntamente con otro biocida (debido a su escasa efectividad) en la sanitización de unidades de flujos laminares y superficies en el laboratorio. Para los fagos de *Lb. plantarum* estudiados en la presente Tesis, si bien el etanol al 100% fue el más eficaz, una concentración de 50% resultó más efectiva que 75%. Estos resultados son extraños y no ha sido reportado aún un comportamiento similar.

El isopropanol no resultó efectivo en la inactivación de partículas fágicas de *Lb. plantarum*. El mismo comportamiento fue observado para fagos de otras especies bacterianas (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003; Capra y col., 2004; Ebrecht y col., 2010). Buzrul y col. (2007) reportaron que el isopropanol (50% y 75%) inactivó completamente partículas fágicas de lactococos, pero, su efectividad fue menor que la del etanol.

Los cuatro fagos de *Lb. plantarum* evidenciaron mayor resistencia al tratamiento con hipoclorito de sodio que la reportada para los fagos de *St. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999) y *L. lactis* (Suárez y Reinheimer, 2002). Una exposición a 800 ppm de este compuesto durante 15 min (fago B2) y 30 min (fago B1, FAGK1 y FAGK2) produjo la completa inactivación de las suspensiones fágicas; sin embargo, esta concentración es mayor a la permitida en la industria de alimentos (200 ppm) y podría además dañar el material metálico de los equipos. Por lo tanto, el uso de este biocida en concentraciones que aseguren la inactivación fágica no es posible en ambientes industriales pero sí en laboratorios. Similar comportamiento fue reportado para fagos de *Lb. casei* y *Lb. paracasei* (Capra y col., 2004; Mercanti y col., 2012). Por su parte, concentraciones de 100 a 300 ppm produjeron recuentos no detectables para fagos de *St. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999), *L. lactis* (Suárez y Reinheimer, 2002) y *Lb. delbrueckii* (Ebrecht y col., 2010). El fago Ib₃ (*Lb. delbrueckii*) exhibió una resistencia extremadamente alta a este agente químico ya que fueron necesarias concentraciones de 1200 ppm aplicadas durante 45 min para inactivar las partículas fágicas (Quiberoni y col., 2003).

En base a los resultados obtenidos en esta Tesis, se plantea la posibilidad de aplicación de procesos fotocatalíticos con TiO₂ como una estrategia alternativa para la inactivación de bacteriofagos. La efectividad de esta metodología en la inactivación fue dependiente del fago, obteniéndose la mayor eficiencia de inactivación para los cuatro fagos de *Lb. plantarum* mientras que la menor eficiencia fue observada para los fagos 342 y 204 de *Lb. delbrueckii*, los cuales poseen cabeza prolata. En particular, la inactivación completa de los fagos de *Lb. plantarum* se logró cuando se aplicaron tratamientos fotocatalíticos ya que en presencia de radiación UV solamente se logró una eliminación parcial de las partículas fágicas.

Existe escasa información sobre estudios aplicando esta metodología (luz UV con o sin catalizador) para lograr la eliminación de partículas fágicas. Estos estudios están orientados principalmente al fago MS-2 (*E. coli*) utilizado como modelo viral. Para este fago y utilizando longitudes de onda de 300 a 400 nm se logró una inactivación del 90%, la cual

fue incrementada al 99% cuando se agregó sulfato ferroso. Este incrementó en la inactivación puede ser debido a la reacción del fentón, la cual incrementa la producción de radicales hidroxilos que producirían la degradación de la partícula fágica (Sjogren y Sierka, 1994).

Con respecto a fagos de bacterias lácticas, Kakita y col. (2000) reportaron la efectividad de la radiación UV (300 - 400 nm) en presencia del catalizador TiO₂ para la inactivación del fago PL-1 (*Lb. casei*). Luego del proceso de inactivación, se observó la presencia de partículas fágicas fantasmas (sin material genético). Sin embargo, a diferencia de la metodología aplicada en esta Tesis, aquel estudio se llevó a cabo en medio líquido. Posteriormente, Kashige y col. (2001) estudiaron las posibles causas de la inactivación, encontrando que, en primer lugar, se produce un daño de la estructura proteica de la cápside seguido por la fragmentación del material genético. El daño es causado por especies oxidantes (O⁻² y ·OH) generadas en el film de TiO₂ por acción de la luz UV y cuya presencia fue confirmada por análisis químicos. Por otro lado, la única información disponible en cuanto a la inactivación con radiación UV de fagos de *Lb. plantarum*, muestra que la cantidad de energía (UV 254 nm) requerida para inactivar el 90% de las partículas fágicas del fago fri fue de 1020 erg/mm² (Trevors y col., 1983).

El único estudio que informa la fotocatalisis de virus contenidos en bioaerosoles (al igual que en esta Tesis) es el de Bonazza (2007). En este trabajo, el virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de *Anticarsia Gemmatalis* (AgMNPV) fue irradiado en presencia o ausencia del catalizador (TiO₂) durante 2 hs. Durante el tratamiento fotoquímico (en ausencia del catalizador) se logró una reducción de los recuentos fágicos de 2 órdenes logarítmicos, la cual fue superior a 4 órdenes logarítmicos en presencia del catalizador. Además, se reportó una cinética de primer orden tanto durante la inactivación fotoquímica como fotocatalítica.

Con respecto al aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes, este es el único trabajo que reporta el aislamiento de variantes fagorresistentes de bacterias lácticas utilizando cócteles de fagos. De las metodologías utilizadas se observó que el MA fue más efectivo que la metodología de CS. Sin embargo, para *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. helveticus* se obtuvieron resultados opuestos (Binetti, 2001; Gugliemotti y col., 2006; Quiberoni y col., 1998b).

La obtención de mutantes confirmados fue menos eficiente cuando se utilizó el fago B2, ya que las variantes presuntivas obtenidas revirtieron rápidamente el fenotipo fagorresistencia. De manera similar, cuando se utilizaron cócteles de fagos, la mayoría de los mutantes resultaron sensibles al fago B2.

La estabilidad de la fagorresistencia no estuvo uniformemente distribuida entre los mutantes aislados de *Lb. plantarum* ATCC 8014. Los mutantes obtenidos bajo presión del fago B2, ya sea de manera individual o utilizando cócteles de fagos, fueron menos estables en presencia de dicho fago. La dificultad en la obtención de mutantes fagorresistentes confirmados y estables utilizando el fago B2 podría estar relacionada a una elevada proporción de variantes resistentes al fago B1 en la población celular de *Lb. plantarum* ATCC 8014. Como consecuencia de ello, la probabilidad de aislar mutantes más estables con respecto a este fago, estaría incrementada. Analizando el comportamiento de mutantes obtenidos a partir de otras bacterias lácticas, las variantes fagorresistentes de *Lb. helveticus* aisladas utilizando el fago hv mostraron baja estabilidad ya que sólo el 15% de ellos evidenció resistencia hasta el séptimo repique (Quiberoni y col., 1998b). Binetti y col. (2007a) reportaron diversidad en los porcentajes de mutantes estables de *St. thermophilus*, obteniéndose valores de entre el 0% y 100% dependiendo del sistema estudiado. De manera similar, para *Lb. delbrueckii* se encontraron comportamientos diferentes en cuanto a los porcentajes de estabilidad, que oscilaron entre 40% y 100% (Guglielmotti y col., 2006).

En general, las variantes obtenidas a partir de *Lb. plantarum* ATCC 8014 y PLN mostraron elevados niveles de fagorresistencia al igual que los mutantes de otras especies de bacterias lácticas (Quiberoni y col., 1998b; Guglielmotti y col., 2006; Binetti y col., 2007a). Moineau y Lévesque (2005) sugieren que las variantes con elevada (EOP entre 10^{-9} y 10^{-7}) y mediana (EOP entre 10^{-6} y 10^{-4}) fagorresistencia son excelentes candidatos para ser usados en elaboraciones lácteas ya que los sistemas con bajos niveles de fagorresistencia (EOP entre 10^{-3} y 10^{-1}) podrían no ser seguros durante los procesos fermentativos.

Luego de estudiar la estabilidad del fenotipo fagorresistencia de las variantes aisladas y el nivel de fagorresistencia (EOP), se procedió a estudiar los mecanismos (extra o intracelulares) involucrados en la resistencia fágica. Se detectó liberación espontánea de fagos en los sobrenadantes de algunos de los mutantes; sin embargo, el fenómeno no fue repetitivo. Cuando uno de estos mutantes y la cepa madre (*Lb. plantarum* ATCC 8014) fueron tratados con mitomicina C se observó la liberación de profagos, aunque los lisados obtenidos no fueron capaces de infectar las cepas de *Lb. plantarum* ensayadas. Un comportamiento similar fue observado en mutantes fagorresistentes de *St. thermophilus* (Binetti, 2001). Por el contrario, la ausencia de mecanismos de fagorresistencia ligados a lisogenia fueron informados para mutantes fagorresistentes de *Lb. delbrueckii* y *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1998b; Guglielmotti y col., 2006).

Caso y col. (1995) estudiaron la inducción de cepas de *Lb. plantarum* con mitomicina C, aunque al igual que los resultados obtenidos en esta Tesis, resultó difícil encontrar cepas indicadoras para los profagos potencialmente liberados. En el caso de los fagos temperados liberados por las cepas lisógenas *Lb. plantarum* CECT 3833 y ATCC 14917, y que fueron propagados sobre *Lb. plantarum* C3.8, se obtuvieron títulos que variaron entre 10^4 UFP/ml y 10^6 UFP/ml. Sin embargo, estos títulos decayeron muy rápidamente y no se observó la presencia de partículas fágicas luego de pocos días a 4°C.

Por otro lado, si bien la cepa *Lb. plantarum* WCSF1 no es inducible por mitomicina C, a través del secuenciamiento de su genoma, se ha observado la presencia de cuatro profagos. Los profagos Lp1 y Lp2 evidenciaron una longitud de 40 kb y se encontraron similitudes entre sus genes. Ambos profagos albergan ARNt y presentaron similitudes con fagos de la familia *Siphoviridae* y, en particular, del tipo *pac*. Los profagos R-Lp3 y RLp4, presentaron truncamiento en los módulos de lisogenia y replicación de ADN y, en particular, el profago R-Lp3 evidenció similitudes con fagos de la familia *Siphoviridae*, del tipo *cos* (Ventura y col., 2003; Chibani-Chennoufi y col., 2004).

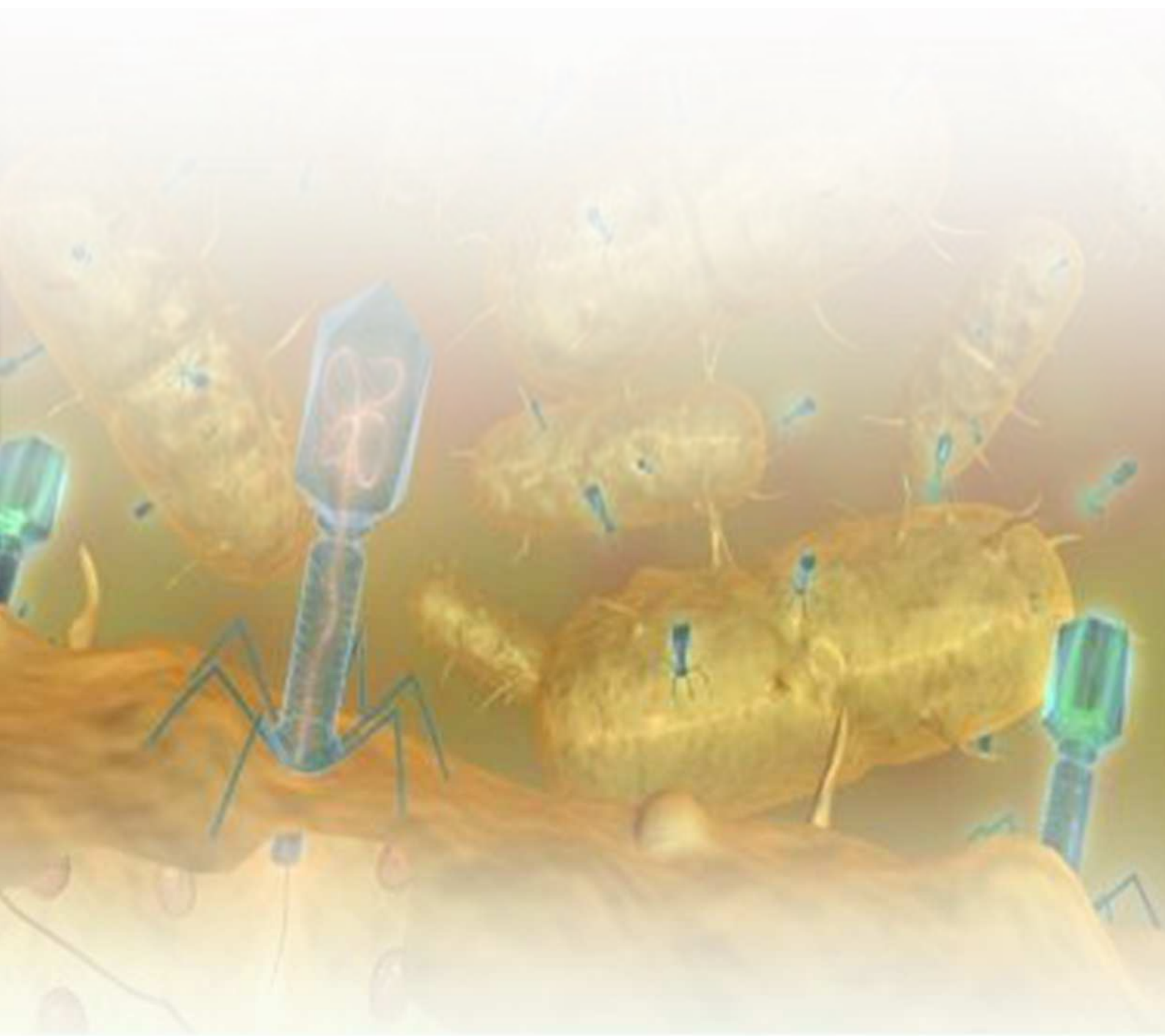
La mayoría de las variantes de *Lb. plantarum* ATCC 8014 obtenidas usando el fago B1 o el fago B2 fueron parcial o completamente incapaces de adsorber partículas fágicas indicando la presencia de bloqueo de la adsorción como mecanismo de resistencia fágica. Por el contrario, el 52% de los mutantes obtenidos bajo presión de ambos fagos mostraron elevadas tasas de adsorción (31 - 100%). Con respecto a los mutantes obtenidos con *Lb. plantarum* PLN, la mayoría de ellos presentaron tasas de adsorción intermedias. La interferencia en la adsorción como mecanismo de fagorresistencia fue evidenciada para *Lb. helveticus* (Neviani y col., 1992; Quiberoni y col., 1998b). Moineau y Lévesque (2005) reportaron la posibilidad de producción de alguna sustancia sobre la superficie bacteriana que podría conducir a la disminución en la eficiencia de la adsorción. Para *St. thermophilus* y algunos sistemas de *Lb. delbrueckii* se encontraron elevadas tasas de adsorción, lo cual indicaría la interferencia en la inyección del ADN, la presencia de mecanismos de resistencia intracelulares (R/M o Abi) o una combinación de ellos (Binetti, 2001; Guglielmotti y col., 2006).

Las variantes fagorresistentes aisladas en esta Tesis presentaron elevada homología genética (> 88%) con su cepa madre, *Lb. plantarum* ATCC 8014, de acuerdo a los perfiles RAPD-PCR obtenidos.

Las variantes no fueron capaces de desarrollar en LDR aunque en el medio EM-glucosa alcanzaron bajos valores de pH (< 3,8) a las 24 hs, demostrando adecuadas

propiedades tecnológicas en un medio de cultivo utilizado a nivel industrial. El mutante MC4, obtenido empleando cócteles de fagos, fue capaz de desarrollar en el medio EM-glucosa durante la minielaboración de leche fermentada en presencia de ambos fagos (B1 y B2). Esta variante alcanzó un pH de 4,5 y elevados recuentos celulares a las 7,5 hs, mientras que los títulos fágicos permanecieron sin variación ya que las partículas fágicas no tuvieron la posibilidad de propagarse. En cambio, en la leche fermentada elaborada con la cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014, se evidenciaron valores de pH superiores, bajos recuentos celulares y elevados títulos de partículas fágicas. De acuerdo a lo reportado por Moineau y Lévesque (2005), una forma de evaluar la efectividad en el empleo de variantes fagorresistentes a nivel industrial es por su capacidad para fermentar la leche en presencia de fagos. Por lo tanto, la variante estudiada en esta Tesis sería un buen candidato para ser usado en la elaboración de productos fermentados. Dicha variante se sumaría al elenco de variantes fagorresistentes derivadas de otras especies de bacterias lácticas, que han sido exitosamente empleadas como herramienta para enfrentar los ataques fágicos ocurridos durante las elaboraciones de productos lácteos fermentados (King y col., 1983; Quiberoni y col., 1998a, 1998b; Sturino y Klaenhammer, 2004).

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis demostró que, en general, los fagos de *Lb. plantarum* estudiados no evidenciaron diferencias en su comportamiento cuando fueron caracterizados desde un punto de vista fenotípico.

Sin embargo, a través de estudios moleculares fue posible diferenciar los fagos B1 y B2 en cuanto al tamaño del genoma, cantidad y tamaño de proteínas estructurales y mecanismo de empaquetamiento del ADN. Estos resultados fueron acordes a los reportados para otros fagos de *Lb. plantarum*.

Los fagos B1 y B2 forman parte de la familia *Siphoviridae* con dimensiones morfológicas acordes a la familia fágica y a la especie bacteriana.

Con respecto a la interacción demostrada con sus cepas sensibles, se observó que el fago B2 resultó infectivo para un elevado número de cepas y los valores de burst size variaron de acuerdo al sistema estudiado. Por otro lado, la lisis en medio líquido y la formación de placas de lisis se vieron favorecidas en presencia de iones calcio.

Algunos sistemas de *Lb. plantarum* requirieron elevados tiempos para alcanzar tasas de adsorción altas y, en concordancia, la lisis celular para estos sistemas ocurrió tardíamente, evidenciando la posible presencia de mecanismos de fagoresistencia, relacionados a un bloqueo en la adsorción. Adicionalmente, para algunas cepas, se evidenciaron otros mecanismos de fagoresistencia, como la presencia de sistemas del tipo R/M.

Los factores ambientales y fisiológicos presentaron escasa influencia sobre la adsorción fágica a células de *Lb. plantarum* ATCC 8014. Esta etapa del ciclo vital fue afectada por pocos factores: tratamiento térmico de la cepa hospedadora, incubación a temperaturas de 50°C y elevados valores de pH. Desafortunadamente, estas condiciones no son comúnmente aplicadas durante la manufactura de productos lácteos fermentados, lo cual limita el desarrollo de posibles estrategias para disminuir la propagación fágica.

Los receptores fágicos evidenciaron naturaleza hidrocarbonada, aunque no fue posible, con la aplicación de diversas metodologías identificar los monosacáridos involucrados en la etapa de adsorción. Por otro lado, el proceso de adsorción resultó ser irreversible para todos los sistemas estudiados.

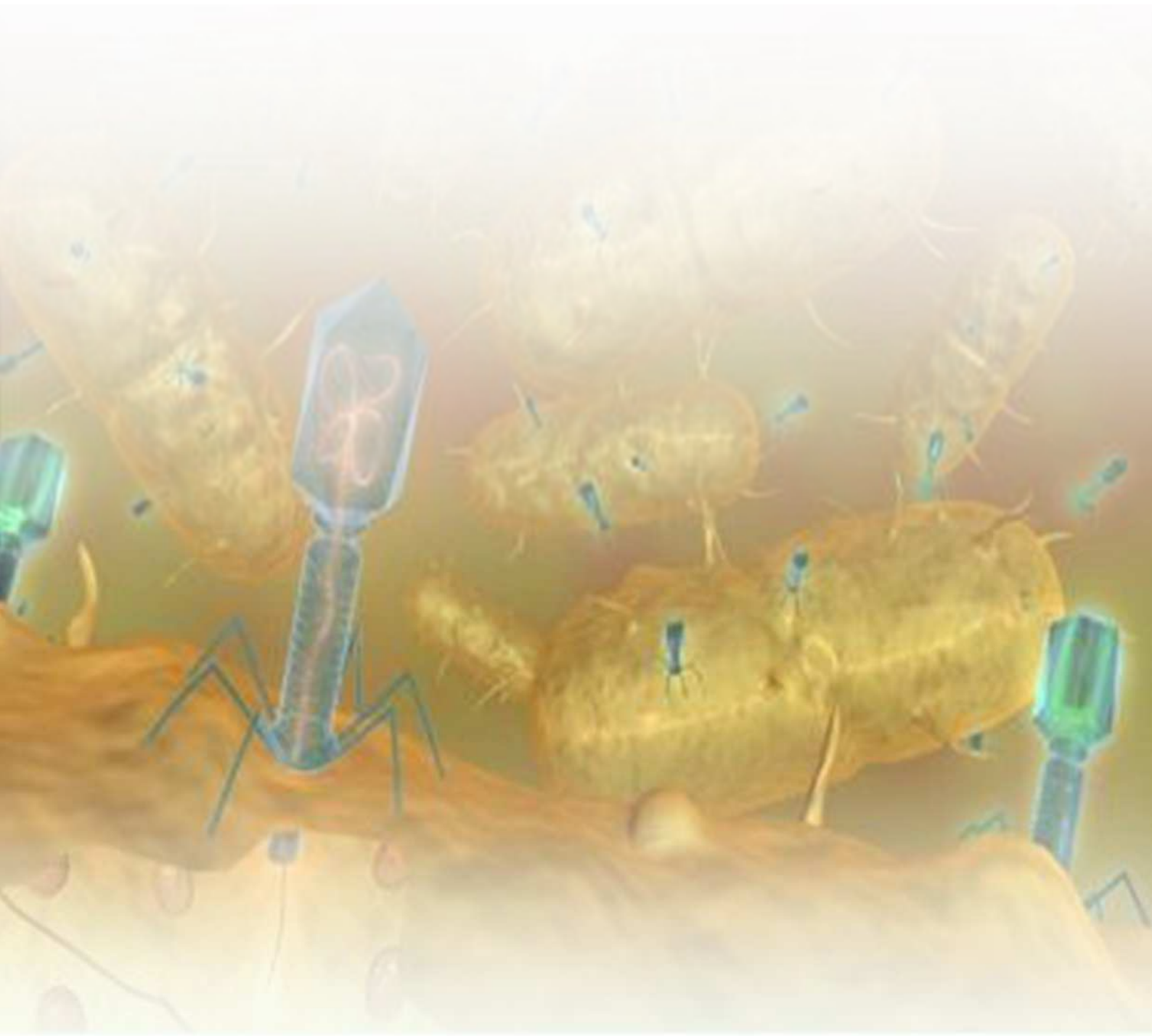
Con respecto al estudio de diversas estrategias que podrían aplicarse para disminuir, de manera directa o indirecta, el riesgo de infecciones fágica se observó que los fagos fueron resistentes a los procesos de pasteurización aplicados a la leche durante la elaboración de

productos lácteos fermentados. Sólo un tratamiento térmico de 5 min a 90°C produciría la inactivación completa de las partículas fágicas. En cuanto al tratamiento con agentes químicos, el ácido peracético resultó ser el biocida más efectivo ya que produjo la inactivación viral dentro de los 5 min de exposición. Este biocida podría ser utilizado para la limpieza de equipos y además presenta la ventaja de eficiencia a bajas concentraciones y su descomposición en residuos no tóxicos (oxígeno y ácido acético o sus sales). Por otro lado, el hipoclorito de sodio resultó efectivo pero a concentraciones que se encuentran por encima de las permitidas en industrias alimenticias, por lo que su uso se limitaría sólo a los laboratorios.

El empleo de fotocatalisis, utilizando TiO_2 como catalizador, en general resultó efectivo no sólo en la inactivación de fagos de *Lb. plantarum* sino de aquellos pertenecientes a otras especies de bacterias lácticas. Por lo tanto, su aplicación podría disminuir la carga viral contenida en bioaerosoles en los ambientes industriales. Sin embargo, resultaría indispensable llevar a cabo estudios relacionados al mecanismo de inactivación fágica para poder diseñar equipos y/o adaptar los ya existentes y así poder utilizarlos en las plantas industriales.

Por otro lado, fue posible obtener mutantes fagorresistentes mediante metodologías naturales, por lo que no existirían restricciones reglamentarias para su uso. En particular, uno de los mutantes, aislado usando cócteles de fagos (B1 + B2) fue capaz de resistir la presencia de ambos fagos en alto título durante la elaboración y posterior almacenamiento refrigerado de leche fermentada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann, H.W. (2005) *Bacteriophage classification*. En: *Bacteriophages: biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 67-89.

Ackermann, H.W. (2009) *Phage classification and characterization*. *Methods Mol. Biol.* 501: 127-140.

Akopyanz, N.; Bukanov, N.O.; Westblom, T.U.; Kresovich, S. y Berg, D.E. (1992) *DNA diversity among clinical isolates of Helicobacter pylori detected by PCR-based RAPD fingerprinting*. *Nucleic Acids Res.* 20: 5137-5142.

Alatossava, T. y Klaenhammer, T.R. (1991) *Molecular characterization of three small isometric-headed bacteriophages which vary in their sensitivity to the lactococcal phage resistance plasmid pTR2030*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1346-1353.

Alatossava, T.; Forsman, P.; Mikkonen, M.; Räisänen, L. y Vasala, A. (1998) *Molecular genetics and evolution of Lactobacillus phage LL-H and its related phages*. *Recent. Res. Devel. in Agricultural and Biological Chem.* 2: 345-360.

Altic, L.C.; Rowe, M.T. y Grant, I.R. (2007) *UV light inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk as assessed by FASTPlaqueTB phage assay and culture*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3728-3733.

Arendt, E.K.; van de Guchte, M.; Coffey, A.G.; Daly, C. y Fitzgerald, G.F. (1993) *Molecular genetics of bacteriophages of lactic acid bacteria*. *Lait* 73: 1901-1198.

Atamer, Z.; Ali, Y.; Neve, H.; Heller, K.J. y Hinrichs, J. (2011) *Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy Leuconostoc starter cultures*. *Int. Dairy J.* 21: 327-334.

Atamer, Z.; Dietrich, J.; Müller-Merbach, M.; Neve, H.; Heller, K.J. y Hinrichs, J. (2009) *Screening for and characterization of Lactococcus lactis bacteriophages with high thermal resistance*. *Int. Dairy J.* 19: 228-235.

Atamer, Z.; Dietrich, J.; Neve, H.; Heller, K.J. y Hinrichs, J. (2010) *Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages*. *Int. Dairy J.* 20:408-414.

Atamer, Z. y Hinrichs, J. (2010) *Thermal inactivation of the heat-resistant Lactococcus lactis bacteriophage P680 in modern cheese processing*. *Int. Dairy J.*: 20: 163-168.

- Auad, L.; Ruiz Holgado, A.A.P.; Forsman, P.; Alatosava, T. y Raya, R.R. (1997) *Isolation and characterization of a new Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus temperate bacteriophage*. J. Dairy Sci. 80: 2706-2712.
- Awad, S.; Ahmed, N. y El Soda, M. (2010) *Influence of microfiltration and adjunct culture on quality of Domiati cheese*. J. Dairy Sci. 93: 1807-1814.
- Azcarate-Peril, M.A. y Klaenhameer, T.R. (2010) *Genomics of lactic acid bacteria: The post-genomics challenge-from sequence to function*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 35-56.
- Basyigit Kilic, G.B.; Kuleasan, H.; Eralp, I. y Karahan, A.G. (2009) *Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains*. LWT - Food Sci. Technol. 42: 1003-1008.
- Bedia, M.; Méndez, L. y Bañón, S. (2011) *Evaluation of different starter cultures (Staphylococci plus Lactic Acid Bacteria) in semi-ripened Salami stuffed in swine gut*. Meat Sci. 87: 381-386.
- Beganović J.; Pavunc, A.L.; Gjurčić, K.; Spoljarec, M.; Sušković, J. y Kos, B. (2011) *Improved sauerkraut production with probiotic strain Lactobacillus plantarum L4 and Leuconostoc mesenteroides LMG 7954*. J. Food Sci. 76: 124-129.
- Bevilacqua, A.; Altieri, C.; Corbo, M.R.; Sinigaglia, M. y Ouoba LI. (2010) *Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives: selection of potential multifunctional starter cultures*. J. Food Sci. 75: 536-544.
- Binetti, A.G. (2001) *Bacteriofagos autóctonos de Streptococcus thermophilus: aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fago resistentes*. Tesis presentada como parte de los requisitos para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química. Universidad Nacional del Litoral.
- Binetti, A.G.; Bailo, N.B. y Reinheimer, J.A. (2007a) *Spontaneous phage-resistant mutants of Streptococcus thermophilus: Isolation and technological characteristics*. Int. Dairy J. 17: 343-349.
- Binetti, A.G.; Capra, M.L.; Alvarez M.A. y Reinheimer J.A. (2008) *PCR method for detection and identification of Lactobacillus casei/paracasei bacteriophages in dairy products*. Int. J. Food Microbiol. 124: 147-153.
- Binetti, A.G.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J.A. (2002) *Phage adsorption to Streptococcus thermophilus: influence of environmental factors and characterization of cell receptors*. Food Res. Int. 35: 73-83.

Binetti, A.G. y Reinheimer, J.A. (2000) *Thermal and chemical inactivation of indigenous Streptococcus thermophilus bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants*. J. Food Prot. 63: 509-515.

Binetti, A.G.; Suárez, V.B.; Tailliez, P. y Reinheimer, J.A. (2007b) *Characterization of spontaneous phage-resistant variants of Streptococcus thermophilus by randomly amplified polymorphic DNA analysis and identification of phage-resistance mechanisms*. Int. Dairy J. 17: 343-349.

Bonazza, H. (2007) *Estudio de la cinética de la inactivación fotocatalítica del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de Anticarsia gemmatalis*. Tesina presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Licenciado en biotecnología. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Bringel, F.; Frey, L.; Boivin, S. y Hubert, J.C. (1997) *Arginine biosynthesis and regulation in Lactobacillus plantarum: the carA gene and the argCJBDF cluster are divergently transcribed*. J. Bacteriol. 179: 2697-2706.

Brüssow, H. y Desiere, F. (2001) *Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages*. Mol. Biol. 39: 213-222.

Brüssow, H. y Kutter, E. (2005) *Genomics and evolution of tailed phages*. En: *Bacteriophages: Biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 91-128.

Bude-Ugarte, M.; Guglielmotti, D.; Giraffa, G.; Reinheimer, J.A. y Hynes, E. (2006) *Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard argentinean cheeses: Genetic characterization and resistance to biological barriers*. J. Food Prot. 69: 2983-2991.

Buzrul, S.; Öztürk, P.; Alpas, H. y Akcelik, M. (2007) *Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages*. LWT Food Sci. Technol. 40: 1671-1677.

Callegari, M.L. (1992) Tesis para obtener el Título de Dottore de Ricerca Della Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia.

Cammarota, M.; De Ros, M.; Stellavato, A.; Lamberti, M.; Marzaioli, I. y Giuliano, M. (2009) *In vitro evaluation of Lactobacillus plantarum DSMZ 12028 as a probiotic: Emphasis on innate immunity*. Int. J. Food Microbiol. 135: 90-98.

Capra, M.L. (2007) *Bacteriofagos de Lactobacillus casei/paracasei. Caracterización y estudio de la fagorresistencia*. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Capra, M.L. y Mercanti, D.J. (2012) *Lysogeny in probiotic lactobacilli*. En: *Bacteriophages in dairy processing* (Eds.: Quiberoni, A. y Reinheimer, J.) New York, NY: Nova Science Publishers, Inc. (en prensa).

Capra, M.L.; Quiberoni, A.; Ackermann, H.W.; Moineau, S. y Reinheimer, J.A. (2006a) *Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of Lactobacillus paracasei*. J. Dairy Sci. 89: 2414-2423.

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

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

Capra, M.L.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J.A. (2009) *Characterization of receptor sites for bacteriophages PL-1, J-1 and MLC-A using two strains of Lactobacillus casei*. En: *Contemporary trends in bacteriophage research* (Ed.: Adams, H.T.) New York, NY: Nova Science Publishers, Inc., p. 391-406.

Carlson, K. (2005) *Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches*. En: *Bacteriophages: Biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 437-488.

Carminati, D.; Giraffa, G.; Quiberoni, A.; Binetti, A.; Suárez, V. y Reinheimer, J. (2010) *Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 177-192.

Carminati, D.; Zennaro, R.; Neviani, E. y Giraffa, G. (1993) *Selezioni e caratteristiche di mutanti fago-resistenti de Lactobacillus helveticus*. Ciencia e Técnica Lattiero-Casearia 44: 33-48.

Caso, J.L.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Herrero, M.; Montilla, A.; Rodríguez, A. y Suarez, J.E. (1995) *Isolation and characterization of temperate and virulent bacteriophage of Lactobacillus plantarum*. J. Dairy Sci. 78: 741-750.

Cebeci, A., y Gürakan, C. (2003) *Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains*. Food Microbiol. 20: 511-518.

Champagne, C.P.; Aachary, A.A. y Propulla, S.G. (2011) *Technology and stability of probiotic and prebiotics in fruit and vegetable foods*. En: *Probiotic and prebiotic foods*:

Technology, stability and benefits to human health (Eds.: Shah, N.P.; da Cruz, A y Faria, J.) Nova Science Publishers, p. 365-404.

Chibani-Chennoufi, S.; Dillmann, M.L.; Marvin-Guy, L.; Rami-Shojaei, S. y Brüssow, H. (2004) *Lactobacillus plantarum LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family Myoviridae*. J. Bacteriol. 186: 7069-7083.

Cho, M.; Chung, H.; Choi, W. y Yoon, J. (2005) *Different inactivation behaviors of MS-2 phage of Escherichia coli in TiO₂ photocatalytic disinfection*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 270-275.

Chow, J.J.; Batt, C.A. y Sinskey, A.J. (1988) *Characterization of Lactobacillus bulgaricus ch2*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1138-1142.

Cluzel, P.J.; Veaux, M.; Rousseau, M. y Accolas, J.P. (1987) *Evidence for temperate bacteriophages in two strains of Lactobacillus bulgaricus*. J. Dairy Res. 54: 397-405.

Collins, B.; Cotter, P.D.; Hill, C. y Ross, R.P. (2010) *Applications of lactic acid bacteria-produced bacteriocins*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 89-109.

Corsetti, A. y Gobetti, M. (2003) *Lactobacillus plantarum*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Elsevier Science, Cornwall, UK, p. 1501-1507.

Corsetti, A. y Valmorri, S. (2011) *Lactobacillus spp.: Lactobacillus plantarum*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2° Edición (Volumen 3), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 111-118.

Daoust, D.R., El-Bisi, H.M. y Litsky, W. (1965) *Thermal destruction kinetics of a lactic streptococcal bacteriophage*. Appl. Microbiol. 13: 478-485.

Daugelavicius, R.; Bamford, J. y Bamford, D. (1997) *Changes in host cell energetics in response to bacteriophage PRD1 DNA entry*. J. Bacteriol. 179: 5203-5210.

De Angelis, M.; de Candia, S.; Calasso, M.P.; Faccia, M.; Guinee, T.P.; Simonetti, M.C. y Gobetti, M. (2008) *Selection and use of autochthonous multiple strain cultures for the manufacture of highmoisture traditional Mozzarella cheese*. Int. J. Food Microbiol. 125: 123-132.

De Angelis, M. y Gobetti, M. (2011) *Lactobacillus spp.: general characteristics*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2° Edición (Volumen 3), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 78-90.

De Antoni, G.; Zago, M.; Vasek, O.; Giraffa, G.; Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J. y Suárez, V. (2010) *Lactobacillus plantarum bacteriophages isolated from Kefir grains: Phenotypic and molecular characterization*. J. Dairy Res. 77: 7-12.

Delcour, J.; Ferain, T.; Deghorain, M.; Palumbo, E. y Hols, P. (1999) *The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek 76: 159-184.

Devi, S.M. y Halami, P.M. (2011) *Detection and characterization of pediocin PA-1/AcH like bacteriocin producing lactic acid bacteria*. Curr. Microbiol. 63: 181-185.

de Vries, M.C.; Vaughan, E.E.; Kleerebezem, M. y de Vos, W.M. (2006) *Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract*. Int. Dairy J. 16: 1018-1028.

De Vuyst, L.; Lefeber, T.; Papalexandratou, Z. y Cam, N. (2010) *The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 301-325.

Doi, K.; Zhang, Y.; Nishizaki, Y.; Umeda, A.; Ohmomo, S. y Ogata, S. (2003) *A comparative study and phage typing of silage-making Lactobacillus bacteriophages*. J. Biosci. Bioeng. 95: 518-525.

Douglas, L.J. y Wolin, M.J. (1971) *Cell wall polymers and phage lysis of Lactobacillus plantarum*. Biochem. 10: 1551-1555.

Drake, S. y Drake, M.A. (2011) *Application of sensory methods to development of probiotic and prebiotic foods*. En: *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to human health* (Eds.: Shah, N.P.; da Cruz, A. y Faria, J.) Nova Science Publishers, p. 113-129.

Duan, Y.; Tan, Z.; Wang, Y.; Li, Z.; Li, Z.; Qin, G.; Huo, Y. y Cai, Y. (2008) *Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese*. J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 51-60.

Dupuis, M.E. y Moineau, S. (2010) *Genome organization and characterization of the virulent lactococcal phage 1358 and its similarities to Listeria phages*. App. Environ. Microbiol. 76: 1623-1632.

Durmaz, E.; Miller, M.J.; Azcarate-Peril, M.A.; Toon, S.P. y Klaenhammer, T.R. (2008) *Genome sequence and characteristics of Lrm1, a prophage from industrial Lactobacillus rhamnosus strain M1*. App. Environ. Microbiol. 74: 4601-4609.

- Ebrecht, A.; Guglielmotti, D.M.; Tremmel, G.; Reinheimer, J.A.; Suárez, V.B. (2010) *Temperate and virulent Lactobacillus delbrueckii bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance*. Food Microbiol. 27: 515-520.
- Eguchi, T.; Doi, K.; Nishiyama, K.; Ohmomo, S.; Ogata, S. (2000) *Characterization of a phage resistance plasmid, pLKS, of silage-making Lactobacillus plantarum NGRI0101*. Biosci. Biotech. Biochem. 64: 751-756.
- Ercolini, D.; Hill, P.J. y Dodd, C.E.R. (2003) *Bacterial community structure and location in Stilton cheese*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3540-3548.
- Essid, I.; Medini, M. y Hassouna, M. (2009) *Technological and safety properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from a Tunisian traditional salted meat*. Meat Sci. 81: 203-208.
- Fabrizio, S.V.; Ledford, R.A. y Parada, J.L. (1999) *Heat resistance of Lactococcus lactis bacteriophages*. Microbiol. Alim. Nutr. 17: 191-198.
- Farnworth, E. y Mainville, I. (2008) *Kefir: A fermented milk product*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 89-127.
- Fayol-Messaoudi, D.; Coconnier-Polter, M.H.; Lievin-Le Moal, V.; Atassi, F.; Berger, C.N. y Servin, A.L. (2007) *The Lactobacillus plantarum strain ACA-DC287 isolated from a Greek cheese demonstrates antagonistic activity in vitro and in vivo against Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J. Appl. Microbiol. 103: 657-665.
- Font de Valdez, G.; Gerez, C.L., Torino, M.I. y Rollán, G. (2010) *New trends in cereal-based products using lactic acid bacteria*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 273-287.
- Frank, J.F. y Hassan, A.N. (1998) *Starter cultures and their use*. En: *Applied dairy microbiology* (Eds.: Marth, E.H. y Steele, J.L.) Marcel Dekker Inc. New York, USA p. 131-172.
- Franz, C.M.A.P.; Cho, G. y Holzapfel, W. (2011) *Probiotics: taxonomy and technological features*. En: *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to human health* (Eds.: Shah, N.P.; da Cruz, A. y Faria, J.) Nova Science Publishers, p. 1-23.
- Fujishima, A.; Rao, T.N. y Tryk, D.A. (2000) *Titanium dioxide photocatalysis*. J. Photochem. Photobiol. C. Rev. 1: 1-21.
- Garneau, J. y Moineau, S. (2011) *Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations*. Microb. Cell Fact. 10 (Suppl 1):S20.

Garneau, J.; Tremblay, D.M. y Moineau, S. (2008) *Characterization of 1706, a virulent phage from Lactococcus lactis with similarities to prophages from other Firmicutes*. Virol. 373: 298-309.

Garrote, G.L.; Abraham, A.G. y De Antoni, G.L. (2010) *Microbial interactions in kefir: a natural probiotic drink*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 327-340.

Gaudana, S.B.; Dhanani, A.S. y Bagchi, T. (2010) *Probiotic attributes of Lactobacillus strains isolated from food and of human origin*. British J. Nutr. 103: 1620-1628.

Gerez, C.L.; Torino, M.I.; Obregozo, M.D. y Font de Valdez, G. (2010) *A ready-to use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread*. J. Food Prot. 73: 758-62.

Guglielmotti, D.M. (2003) *Fagos autóctonos de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles*. Tesis presentada para acceder al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.

Guglielmotti, D.; Deveau, H.; Binetti, A.; Reinheimer, J.; Moineau, S. y Quiberoni, A. (2009) *Genome analysis of two virulent Streptococcus thermophilus phages isolated in Argentina*. Int. J. Food Microbiol. 136: 191-109.

Guglielmotti, D.M.; Reinheimer, J.A.; Binetti, A.G.; Giraffa, G.; Carminati, D. y Quiberoni, A. (2006) *Characterization of spontaneous phage-resistant derivatives of Lactobacillus delbrueckii commercial strains*. Int. J. Food Microbiol. 111: 126-133.

Guo, L.D.; Yang, L.J. y Huo, G.H. (2011) *Cholesterol removal by Lactobacillus plantarum isolated from homemade fermented cream in Inner Mongolia of China*. Czech J. Food Sci. 29: 219-225.

Guttman, B.; Raya, R.; y Kutter, E. (2005) *Basic phage biology*. En: *Bacteriophages: Biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 29-66.

Hahn, F.E.; Weisseman, Jr. C.L. y Hopps, H.E. (1955) *Mode of action of chloramphenicol. III. Action of chloramphenicol on bacterial energy metabolism*. J. Bacteriol. 69: 215-223.

Hamdi, M. (2008) *New trends of table olive processing for quality control and functional properties*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 413-432.

Hammes, W.P.; Haller, D. y Gänzle, M.G. (2008) *Fermented meat*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 291-320.

Heap, H.A. y Harnett, J.T. (2003) *Bacteriophage in the dairy industry*. En: *Encyclopedia of dairy sciences* (Eds. Roginski, H.; Fuquay, J.W. y Fox, P.F.) Academic Press, Elsevier Science, USA. p.136-142.

Heath, S.J.; Lewis, J.D.N. y Candy, D.C.A. (2011) *Mechanisms of probiotics*. En: *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to human health* (Eds.: Shah, N.P.; da Cruz, A. y Faria, J.) Nova Science Publishers, p. 41-48.

Heller, K.J.; Bockelmann, W.; Schrezenmeir, J. y deVrese, M. (2008) *Cheese and its potential as a probiotic food*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 243-266.

Hernández Cruz, P.; Pérez Campos, E.; Martínez Martínez, L.; Ortiz, B. y Martínez, G. (2005) *Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato*. Revista de educación bioquímica 24: 21-27.

Holzappel, W.; Schillinger, U. y Buckenhuskes, H. (2008) *Sauerkraut*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 395-412.

Horvath, P. y Barrangou, R. (2010) *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea*. Sci. 327: 167-170.

Hsieh, Y.H.P.; Pao, S. y Li, J. (2008) *Tradicional chinese fermented foods*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 433-474.

Huet, A.; Conway, J.F.; Letellier L. y Boulanger, P. (2010) *In vitro assembly of the T=13 procapsid of bacteriophage T5 with its scaffold domain*. J. Virol. 84: 9350-9358.

Huey, B. y Hall, J. (1989) *Hypervariable DNA fingerprinting in Escherichia coli. Minisatellite probe from bacteriophage M13*. Bacteriol. 171: 2528-2532.

Ishibashi, K.; Takesue, S.; Watanabe, K. y Oishi, K. (1982) *Use of lectins to characterize the receptor sites for bacteriophage PL-1 of Lactobacillus casei*. J. Gen. Microbiol. 128: 2251-2259.

Jaichumjai, P.; Valyasevi, R.; Assavanig, A. y Kurdi, P. (2010) *Isolation and characterization of acid-sensitive Lactobacillus plantarum with application as starter culture for Nham production*. Food Microbiol. 27: 741-748.

Jordan, K.N. y Cogan, T.M. (1999) *Heat resistance of Lactobacillus spp. isolated from Cheddar cheese*. Lett. Appl. Microbiol. 29: 136-140.

Josephsen, J. y Neve, H. (2004) *Bacteriophage and antiphage mechanisms of lactic acid bacteria*. En: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Eds.: Salminen, S.; von Wright, A. y Ouwehand, A.) 3ª Edición, New York, Marcel Dekker, Inc. p. 295-351.

Kakikawa, M.; Oki, M.; Tadokoro, H.; Nakamura, S.; Taketo, A. y Kodaira, K.I. (1996) *Cloning and nucleotide sequence of the major capsid proteins of Lactobacillus bacteriophage Φ gle*. Gene 175: 157-165.

Kakita, Y.; Obuchi, E.; Nakano, K.; Murata, K.; Kuroiwa, A.; Miake, F. y Watanabe, K. (2000) *Photocatalytic inactivation of Lactobacillus PL-1 phage by a thin of titania*. Biocont. Sci. 5: 73-79.

Kashige, N.; Kakita, Y.; Nakashima, Y.; Miake F. y Watanabe, K. (2001) *Mechanism of the photocatalytic inactivation of Lactobacillus casei phage PL-1 by titania thin film*. Curr. Microbiol. 42: 184-189.

Kearney, N.; Stanton, C.; Desmond, C.; Coakley, M.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (2008) *Challenges associated with the development of probiotic-containing functional foods*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 25-70.

King, W.R.; Collins, E.B. y Barret, E.L. (1983) *Frequencies of bacteriophage resistant and slow acid-producing variants of Streptococcus cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1481-1485.

Kleerebezem, M.; Boekhorst, J.; van Kranenburg, R.; Molenaar, D.; Kuipers, O.P.; Leer, R.; Turchini, R.; Peters, S.A.; Sandbrink, H.M.; Fiers, M.W.E.; Stiekema, W.; Klein Lankhorst, R.M.; Bron, P.A.; Hoffer, S.M.; Nierop Groot, M.N.; Kerkhoven, R.; de Vries, M.; Ursing, B.; de Vos, W.M. y Siezen, R.J. (2003) *Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 1990-1995.

Kodaira, K.I.; Oki, M.; Kakikawa, M.; Watanabe, N.; Hirakawa, M.; Yamada, K. y Taketo, A. (1997) *Genome structure of the Lactobacillus temperate phage $w\Phi$ 1e: the whole genome sequence and the putative promoter/repressor system*. Gene 187: 45-53.

Koziumi, Y. y Taya, M. (2002) *Kinetic evaluation of biocidal activity of titanium dioxide against phage MS-2 considering interaction between the phage and photocatalyst particles*. Biochem. Eng. J. 12: 107-116.

Kühn, K.P.; Chaberny, I.F.; Massholder, K.; Stickler, M.; Benz, V.W.; Sonntag, H.G y Erdinger, L. (2003) *Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light*. Chemosphere 53: 71-77.

Kutter, E. y Goldman, E. (2008) *Introduction to bacteriophages*. En: *Practical handbook of microbiology* (Eds.: Goldman, E. y Green, H.L.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 685-707.

Kutter, E.; Raya, R. y Carlson, K. (2005) *Molecular mechanisms of phage infection*. En: *Bacteriophages: Biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos, p. 165-222.

Labrie S.L.; Samson, J.E. y Moineau, S. (2010) *Bacteriophage resistance mechanisms*. Nature Reviews Microbiol. 8: 317-327.

Lash, B.W.; Mysliwiec, T.H. y Gourama, H. (2005) *Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum (ATCC 8014)*. Food Microbiol. 22: 199-204.

Laslett, D. y Canback, B. (2004) *ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences*. Nucleic Acids Res. 32: 11-16.

Lee, H.; Yoon, H.; Ji, Y.; Kim, H.; Park, H.; Lee, J.; Shin, H. y Holzapfel, W. (2011) *Functional properties of Lactobacillus strains isolated from kimchi*. Int. J. Food Microbiol. 145: 155-161.

Lepage, P.; Colombet, J.; Marteau, P.; Sime-Ngando, T.; Doré, J. y Leclerc, M. (2008) *Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages?* Gut 57: 424-425.

Lillehaug, D. (1997) *An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages*. J. Appl. Microbiol. 83: 85-90.

Lu, Z.; Altermann, E.; Breidt, F.; Predki, P.; Fleming, H.P. y Klaenhammer, T.R. (2005) *Sequence analysis of the Lactobacillus plantarum bacteriophage Φ JL-1*. Gene 348: 45-54.

Lu, Z.; Breidt, F.; Fleming, H.P.; Altermann, E. y Klaenhammer, T.R. (2003a) *Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage, JL-1, from a cucumber fermentation*. Int. J. Food Microbiol. 84: 225-235.

Lu, Z.; Breidt, F.; Plengvidhya, V. y Fleming, H.P. (2003b) *Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3192-3203.

Lyne, J. (2011) *Technological importance in the dairy industry*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2º Edición (Volumen 1), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 439-444.

Mäki, M. (2004) *Lactic acid bacteria in vegetable fermentations*. En: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Eds.: Salminen, S.; von Wright, A. y Ouwehand, A.) 3ª Edición, New York, Marcel Dekker, Inc. p. 419-430.

Maloy, S.R.; Cronan, J.E. y Freidfelder, D. (1994) *Phage biology*. En: *Microbial genetics*. Boston, Jones y Bartlett Publishers, Inc., p. 81-100.

Mangia, N.P.; Murgia, M.A.; Garau, G.; Sanna, M.G. y Deiana, P. (2008) *Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening*. *Food Microbiol.* 25: 366-377.

Manolopoulou, E.; Sarantinopoulos, P.; Zoidou, E.; Aktypis, A.; Moschopoulou, E.; Kandarakis, I.G. y Anifantakis, E.M. (2003) *Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening*. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 153-161.

Maragkoudakis, P.A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B. y Tsakalidou, E. (2006) *Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products*. *Int. Dairy J.* 16: 189-199.

Mathara, J. M.; Schillinger, U.; Kutima, P.M.; Mbugua, S.K.; Guigas, C.; Franz, C. y Holzappel, W.H. (2008) *Functional properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya*. *Curr. Microbiol.* 56: 315-321.

Mäyry-Mäkinen, A. y Bigret, M. (2004) *Industrial use and production of lactic acid bacteria*. En: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Eds.: Salminen, S.; von Wright, A. y Ouwehand, A.) 3ª Edición, New York, Marcel Dekker, Inc., p. 175-198.

Mercanti, D.J.; Carminati, D.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2011) *Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry*. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 503-510.

Mercanti, D.J.; Guglielmotti, D.M.; Patrignani, F.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2012) *Resistance of two temperate Lactobacillus paracasei bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application*. *Food Microbiol.* 29: 99-104.

Milesi, M.M.; McSweeney, P.L.H. y Hynes, E.R. (2008a) *Impact of chymosin- and plasmin-mediated primary proteolysis on the growth and biochemical activities of Lactobacilli in miniature Cheddar-type cheeses*. *J. Dairy Sci.* 91: 3277-3290.

Milesi, M.M.; McSweeney, P.L.H. y Hynes, E.R. (2008b) *Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of Lactobacillus plantarum in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type*. *J. Appl. Microbiol.* 105: 884-892.

Moineau, S. (1999) *Applications of phage resistance in lactic acid bacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 377-382.

Moineau, S. y Lévesque, C. (2005) *Control of bacteriophages in industrial fermentations*. En: *Bacteriophages: biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 285-296.

Moineau, S.; Tremblay, D. y Labrie, S. (2002) *Phages of lactic acid bacteria: from genomics to industrial applications*. *ASM News* 68: 388-393.

Molin, G. (2008) *Lactobacillus plantarum: the role in foods and in human health*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 353-394.

Monteville, M.; Ardestani, B. y Geller, B. (1994) *Lactococcal bacteriophages require a host wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3204-3211.

Moore, S. y Kailasapathy, K. (2011) *Microencapsulation: science and technologies for probiotics and prebiotics*. En: *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to human health* (Eds.: Shah, N.P. y da Cruz, A. y Faria, J.) Nova Science Publishers, p. 435-466.

Morales, F.; Morales, J.I.; Hernández, C.H. y Hernández-Sánchez, H. (2011) *Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164: 889-905.

Müller-Merbach, M.; Kohler, K. y Hinrichs, J. (2007) *Environmental factors for phage-induced fermentation problems: Replication and adsorption of the Lactococcus lactis phage P008 as influenced by temperature and pH*. *Food Microbiol.* 24: 695-702.

Müller-Merbach, M.; Neve, H. y Hinrichs, J. (2005) *Kinetics of the thermal inactivation of the Lactococcus lactis bacteriophage P008*. *J. Dairy Res.* 72: 281-286.

Nes, I.F.; Brendehaug, J. y von Husby, K.O. (1988) *Characterization of the bacteriophage B2 of Lactobacillus plantarum ATCC 8014*. *Biochimie* 70: 423-427.

Nes, I.F. y Sorheim, O. (1984) *Effect of infection of a bacteriophage in a starter culture during the production of salami dry sausage*. *J. Food Sci.* 49: 337-340.

Neve, H. (1996) *Bacteriophage*. En: *Dairy starter cultures* (Eds.: Logan, T.M. y Accolas, J.P.) New York, NY: VCH Publishers, Inc, p. 157-190.

Neviani, E.; Carminati, D. y Giraffa, G. (1992) *Selection of some bacteriophage-and lysozyme-resistant variants of Lactobacillus helveticus CNRZ 892*. *J. Dairy Sci.* 75: 905-913.

Nguyen, T.D.T.; Kang, J.H. y Lee, M.S. (2007) *Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects*. Int. J. Food Microbiol. 113: 358-361.

Nieto-Arribas, P.; Poveda, J.M.; Seseña, S.; Palop, L. y Cabezas, L. (2009) *Technological characterization of Lactobacillus isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures*. Food Control 20: 1092-1098.

Pal, A.; Min, S.; Yu, L.E.; Pehkonen, S.O. y Ray, M.B. (2005) *Photocatalytic inactivation of bioaerosols by TiO₂ coated membrane*. Int. J. Chem. Reactor Eng. (3° Volumen): A45.

Pal, A.; Pehkonen, S.O.; Yu, L.E. y Ray, M.B. (2007) *Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light*. J. Photochem. Photobiol. A 186: 335-341.

Paolillo, R.; Romano Carratelli, C.; Sorrentino, S.; Mazzola, N. y Rizzo, A. (2009) *Immunomodulatory effects of Lactobacillus plantarum on human colon cancer cells*. Int. Immunopharmacol. 9: 1265-1271.

Perricone, M.; Bevilacqua, A.; Corbo, M.R. y Sinigaglia, M. (2010) *Use of Lactobacillus plantarum and glucose to control the fermentation of "Bella di Cerignola" table olives, a traditional variety of Apulian region (Southern Italy)*. J. Food Sci. 75: 430-436.

Prajapati, J.B. y Nair, B.M. (2008) *The history of fermented foods*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 1-24.

Quiberoni, A. del L. (1997) *Interacción de bacterias lácticas termófilas con bacteriofagos específicos*. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química.

Quiberoni, A.; Guglielmotti, D.; Binetti, A. y Reinheimer, J. (2004) *Characterization of three Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus phages and the physicochemical analysis of phage adsorption*. J. Appl. Microbiol. 96: 340-351.

Quiberoni, A.; Guglielmotti, D.M. y Reinheimer, J.A. (2003) *Inactivation of Lactobacillus delbrueckii bacteriophages by heat and biocides*. Int. J. Food Microbiol. 84: 51-62.

Quiberoni, A.; Moineau, S.; Rousseau, G.M.; Reinheimer, J.A. y Ackermann, H.W. (2010) *Streptococcus thermophilus bacteriophages*. Int. Dairy J. 20: 657-664.

Quiberoni, A. y Reinheimer, J. (1998) *Physicochemical characterization of phage adsorption to Lactobacillus helveticus ATCC 15807 cells*. J. Appl. Microbiol. 85: 762-768.

Quiberoni, A.; Reinheimer, J.A. y Suárez, V.B. (1998a) *Performance of Lactobacillus*

helveticus *spontaneous phage-resistant mutants in hard cheese production*. *Int. Dairy J.* 8: 941-949.

Quiberoni, A., Reinheimer, J.A., y Tailliez, P. (1998b) *Characterization of Lactobacillus helveticus phage-resistant mutants by RAPD fingerprints and phenotypic parameters*. *Food Res. Int.* 31: 537-542.

Quiberoni, A.; Stiefel, J.I. y Reinheimer, J.A. (2000) *Characterization of phage receptors in Streptococcus thermophilus using purified cells obtained by a simple protocol*. *J. Appl. Microbiol.* 89: 1059-1065.

Quiberoni, A.; Suárez, V.B.; Binetti, A.G. y Reinheimer, J.A. (2011) *Bacteriophage*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2° Edición (Volumen 1), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 430-438.

Quiberoni, A., Suárez, V.B. y Reinheimer, J.A. (1999) *Inactivation of Lactobacillus helveticus bacteriophages by thermal and chemical treatments*. *J. Food Prot.* 62: 894-898.

Quiberoni, A.; Tremblay, D.; Ackermann, H.W.; Moineau, S. y Reinheimer, J.A. (2006) *Diversity of Streptococcus thermophilus phages in a large production cheese factory in Argentina*. *J. Dairy Sci.* 89: 3791-3799.

Ranhand, J.M. (1974) *Simple, inexpensive procedure for the disruption of bacteria*. *Appl. Microbiol.* 28: 66-69.

Rantsiou, K.; Urso, R.; Dolci, P.; Comi, G. y Cocolin, L. (2008) *Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers*. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 36-42.

Rattray, F.P. y O'connell, M.J. (2011) *Kefir*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2° Edición (Volumen 2), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 518-524.

Reinheimer, J.A. (2005) *Estrategias para mejorar la fagorresistencia de bacterias lácticas (BAL)*. *Agrociencia IX* (1 y 2): 379-383.

Reinheimer, J.A.; Morelli, R.; Callegari, M.L. y Bottazzi, V. (1993) *Phage resistance in Lactobacillus helveticus CNRZ 328*. *Microbiologie Aliments Nutrition* 11: 235-240.

Rekha, C.R. y Vijayalakshmi, G. (2011) *Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with $\beta\beta$ -glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62: 111-120.

Ringo, E. (2004) *Lactic acid bacteria in fish and fish farming*. En: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Eds.: Salminen, S.; von Wright, A. y Ouwehand, A.) 3° Edición, New York, Marcel Dekker, Inc. p. 581-610.

Robison, R.K. (2011) *Yogurt: role of starter culture*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2º Edición (Volumen 2), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 529-532.

Rodríguez González, A.; García, P. y Raya, R.R. (2010) *Bacteriophage of lactic acid bacteria*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 111-123.

Sakurai, T.; Takahashi, T.; Kamiyama, K. y Arai, H. (1969) *Isolation of bacteriophages parasitic on Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum and their several properties*. *Virus* 19: 311-324.

Salaün, F.; Mietton, B. y Gaucheron, F. (2005) *Buffering capacity of dairy products*. *Int. Dairy J.* 15: 95-109.

Salovaara, H. (2004) *Lactic acid bacteria in cereal-based products*. En: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Eds.: Salminen, S.; von Wright, A. y Ouwehand, A.) 3º Edición, New York, Marcel Dekker, Inc. p. 431-452.

Sambrook, J. y Russell, D. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3º Edición (Volúmenes 1, 2 y 3) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Samson, J. y Moineau, S. (2010) *Characterization of Lactococcus lactis phage 949 and comparison with other Lactococcal phages*. *Appl. Environ. Microb.* 76: 6843-6852.

Schröder, W. (1984) *Peracetic acid. Disinfectant for the food stuff industry*. *Brauwelt Int.* 1: 115-120.

Sciara, G.; Bebeacua, C.; Bron, P.; Tremblay, D.; Ortiz-Lombardia, M.; Lichiere, J.; Van Heel, M.; Campanacci, V.; Moineau, S. y Cambillau, C. (2010) *Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 6852-6857.

Séchaud, L.; Callegari, M.L.; Rousseau, M.; Muller, M.C. y Accolas, J.P. (1989) *Relationship between temperate bacteriophage 0241 and virulent bacteriophage 832-B1 of Lactobacillus helveticus*. *Neth Milk and Dairy J.* 43: 261-278.

Seltmann, G. y Holst, O. (2002) *The bacterial cell wall*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Siegel, R. y Howell, J. (2002) *Thermal radiation heat transfer* (4º Edición) Hemisphere Publishing Corp., Bristol, PA.

Simonet, J. y Gantzer, C. (2006) *Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7671-7677.

Sjogren, J.C. y Sierka, R.A. (1994) *Inactivation of phage MS2 by iron-aided titanium dioxide photocatalysis*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 344-347.

Sleytr, U.B. y Beveridge, T.J. (1999) *Bacterial S-layers*. Trends Microbiol. 7: 253-260.

Son, V.M.; Chang, C.C.; Wu, M.C.; Guu, Y.K.; Chiu, C.H. y Cheng, W. (2009) *Dietary administration of the probiotic, Lactobacillus plantarum, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immun. 26: 691-698.

Stendid, J.; Karlsson, J.O. y Hogberg, N. (1994). *Intraspecific genetic variation in Heterobasidium annosum revealed by amplification of minisatellite DNA*. Mycol. Res. 98: 57-63.

Stiefel, J.I. (2000) *Caracterización del proceso de adsorción de fagos a bacterias lácticas termófilas*. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Magíster en Ciencia de Alimentos.

Sturino, J.M. y Klaenhammer, T.R. (2004) *Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria*. Review Adv. Appl. Microbiol. 56: 331-378.

Suárez, V.; Moineau, S.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2008a) *Argentinian Lactococcus lactis bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies*. J. Appl. Microbiol. 104: 371-379.

Suárez, V.B.; Quiberoni, A.; Binetti, A.G. y Reinheimer, J.A. (2002) *Infecciones fágicas en la industria láctea Argentina. Incidencias e implicancias*. Revista Argentina de Lactología 21: 57-73.

Suárez, V.B. y Reinheimer, J.A. (2002) *Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian Lactococcus lactis phages*. J. Food Prot. 65: 1756-1759.

Suárez, V.; Zago, M.; Quiberoni, A.; Carminati, D.; Giraffa, G. y Reinheimer, J. (2008b) *Lysogeny in Lactobacillus delbrueckii strains and characterization of two new temperate prolate-headed bacteriophages*. J. Appl. Microbiol. 105: 1402-1411.

Surh, J.; Lee kim, Y.K.; Kwon, H. (2008) *Korean fermented foods: kimchi and doenjang*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 333-352.

Surono, S. y Hosono, A. (2011) *Starter cultures*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2º Edición (Volumen 2), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 477-482.

Svensson V. y Christiansson A. (1991) *Methods for phage monitoring*. FIL-IDF Bulletin 263: 29-39.

Tanasupawat, S. y Visessanguan, W. (2008) *Thai fermented foods: microorganisms and their health benefits*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 495-512.

Todorov, S.D.; Hob, P.; Vaz-Velho, M. y Dicks, L.M.T. (2010) *Characterization of bacteriocins produced by two strains of Lactobacillus plantarum isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal*. Meat Sci. 84: 334-343.

Tremblay, D. y Moineau, S. (1999) *Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of Streptococcus thermophilus*. Virol. 255: 63-76.

Trevors, K.E.; Holley, R.A. y Kempton, A.G. (1983) *Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage isolated from a meat starter culture*. J. Appl. Bacteriol. 54: 281-288.

Trucco, V.; Reinheimer, J.; Quiberoni, A. y Suárez, V.B. (2011) *Adsorption of temperate phages of Lactobacillus delbrueckii strains and phage resistance linked to their cell diversity*. J. Appl. Microbiol. 110: 935-942.

Valyasevi, R.; Sandine, W.E. y Geller, B.L. (1990) *The bacteriophage kh receptor of Lactococcus lactis subsp. cremoris KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1882-1889.

Valyasevi, R.; Sandine, W.E. y Geller, B.L. (1991) *A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of Lactococcus lactis subsp. lactis C2*. J. Bacteriol. 173: 6095-6100.

Valsayevi, R.; Sandine, W. y Geller, B. (1994) *Lactococcus lactis ssp. lactis C2 bacteriophage sk1 receptor involving rhamnose and glucose moieties in the cell wall*. J. Dairy Sci. 77: 1-6.

Van de Water, J. y Naiyanetr, P. (2008) *Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) Boca Raton, FL: CRC Press, p. 129-164.

Vauterin, L. y Vauterin, P. (1992) *Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms*. European Microbiol. 1: 37-41.

Vendramini, A.L.; Miguel, M.A.L. y Guimaraes, R.R. (2011) *Using probiotics in fish products*. En: *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to human health* (Eds.: Shah, N.P.; da Cruz, A. y Faria, J.) Nova Science Publishers, p. 419-434.

Ventura, M.; Callegari, M.L. y Morelli, L. (1999) *Surface layer variations affecting phage adsorption on seven Lactobacillus helveticus strains*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 49: 45-53.

Ventura, M.; Canchaya, C.; Kleerebezem, M.; de Vos, W.M.; Siezen, R.J. y Brüßow, H. (2003) *The prophage sequences of Lactobacillus plantarum strain WCFSI*. *Viol.* 316: 245-255.

Vignolo, G.M.; Fontana, C. y Coconcelly, P.S. (2010) *New approaches for the study of lactic acid bacteria biodiversity: a focus on meat ecosystems*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M.) Iowa, Blackwell Publishing, p. 251-271.

Villion, M. y Moineau, S. (2009) *Bacteriophages of Lactobacillus*. *Front. Biosci.* 14: 1661-1683.

Vizoso Pinto, M.G.; Franz, C.M.A.P.; Schillinger, U. y Holzapfel, W.H. (2006) *Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products*. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 205-214.

Wang, B.; Li, J.; Li, Q.; Zhang, H. y Li, N. (2009) *Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization by Lactobacillus plantarum L2 in the rat gastrointestinal tract*. *Int. J. Food Microbiol.* 132: 59-66.

Wang, S.; Kong, J.; Gao, C.; Guo, T. y Liu, X. (2010) *Isolation and characterization of a novel virulent phage (phiLdb) of Lactobacillus delbrueckii*. *Int. J. Food Microbiol.* 137: 22-27.

Wang, Y.; Chen, C.; Ai, L.; Zhou, F.; Zhou, Z.; Wang, L.; Zhang, H.; Chen, W. y Guo, B. (2011) *Complete genome sequence of the probiotic Lactobacillus plantarum ST-III*. *J. Bacteriol.* 193: 313-314.

Watanabe, K.; Shirabe, M.; Fukuzaki, T.; Kakita, Y.; Nakashima, Y. y Miake, F. (1993) *Electron microscope studies on the host cell energy requirement for injection of PL-1 phage DNA into Lactobacillus casei*. *Curr. Microbiol.* 26: 293-298.

Watanabe, K.; Shirabe, M.; Nakashima, Y. y Kakita, Y. (1991) *The possible involvement of protein synthesis in the injection of PL-1 phage genome into its host, Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2601-2603.

Watanabe, K. y Takesue, S. (1972) *The requirement for calcium in infection with Lactobacillus phage*. *J. Gen. Virol.* 17: 19-30.

Weinbauer, M.G. (2004) *Ecology of prokaryotic viruses*. *FEMS Microbiol. Reviews* 28: 127-181.

Whitehead, W.E.; Ayres, J.W. y Sandine, W.E. (1993) *Symposium: Recent developments in dairy starter cultures: Microbiology and Physiology*. J. Dairy Sci. 76: 2344-2353.

Yamamoto, M.; Kanegasaki, S. y Yoshikawa, M. (1980) *Effects of temperature and energy inhibitors on complex formation between Escherichia coli male cells and filamentous phage fd*. J. Gen. Microbiol. 119: 87-93.

Yokokura, T. (1977) *Phage receptor material in Lactobacillus casei*. J. Gen. Microbiol. 100: 139-145.

Yoon, B.H.; Jang, S.H. y Chang, H.I. (2011) *Sequence analysis of the Lactobacillus temperate phage Sha1*. Arch. Virol. 156: 1681-1684.

Yoon, S.S.; Barrangou-Pouey, R.; Breidt, F.; Klaenhammer, T.R. y Fleming, H.P. (2002) *Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 973-976.

Yoon, S.S.; Kim, J.W.; Breidt, F. y Fleming, H.P. (2001) *Characterization of a lytic Lactobacillus plantarum bacteriophage and molecular cloning of a lysin gene in Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 65: 63-74.

Yu, J.; Wang, W.H.; Menghe, B.L.G.; Jiri, M.T.; Wang, H.M.; Liu, W.J.; Bao, Q.H.; Lu, Q.; Zhang, J.C.; Wang, F.; Xu, H.Y.; Sun, T.S. y Zhang, H.P. (2011) *Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia*. J. Dairy Sci. 94: 3229-3241.

Zacarias, S.M.; Vaccari, M.C.; Alfano, O.M.; Irazoqui, H.A. y Imoberdorf, G.E. (2010) *Effect of the radiation flux on the photocatalytic inactivation of spores of Bacillus subtilis*. J. Photochem. Photobiol. A 214: 171-180.

Zago, M.; Fornasari, M.E.; Carminati, D.; Burns, P.; Suárez, V.; Vinderola, G.; Reinheimer, J. y Giraffa, G. (2011) *Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses*. Food Microbiol. 28: 1033-1040.

Zhang, W.Y.; Yu, D.L.; Sun, Z.H.; Chen, W.; Hu, S.N.; Meng, H. y Zhang, H.P. (2010) *The comparative analysis of a prophage remnant Lcazh1 in relation to other Lactobacillus prophages, particularly Lp3*. Int. J. Dairy Technol. 63: 413-417.

Zhang, Z.Y.; Liu, C.; Zhu, Y.Z.; Zhong, Y.; Zhu, Y.Q.; Zheng, H.J.; Zhao, G.P.; Wang, S.Y. y Guo, X.K. (2009) *Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum JDMI*. J. Bacteriol. 191: 5020-5021.