VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SISTEMAS CRISPR EN CEPAS DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

Fiorito, Lucila

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) (UNL-CONICET), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829, Santa Fe.

Director: Mercanti, Diego; **Co-director**: Pujato, Silvina

Área: Ciencias Biológicas

Palabras Clave: CRISPR-Cas, *Streptococcus thermophilus*, Bacteriófagos

INTRODUCCIÓN

Los bacteriofagos (fagos) son virus que infectan células procariotas, y están presentes en todo ecosistema donde existan bacterias, no siendo excepciones ni la leche cruda ni las plantas lácteas donde la misma es procesada. Las primeras fermentaciones de leche eran artesanales y empíricas, antes de conocerse el rol de las bacterias lácticas en este proceso. Estos ecosistemas naturales poseen una diversidad bacteriana muy amplia, la presencia de fagos es normal y no resulta un problema visible, ya que coexisten ciclos de infección (en una parte de la población bacteriana), y de crecimiento simultáneo de cepas resistentes, también presentes en el ecosistema (Spus y col., 2015). El enorme crecimiento posterior de la industria láctea requirió la adaptación de procesos y un alto grado de estandarización de la calidad y características de los productos lácteos fermentados. Como consecuencia, los fermentos naturales se reemplazaron progresivamente por cultivos comerciales con una o unas pocas cepas seleccionadas, caracterizadas y adaptadas a la producción de alimentos con características muy definidas y particulares (Powell y col., 2011). Un efecto colateral fue la aparición cada vez más frecuente de problemas de acidificación debidos a infecciones fágicas. Al tratarse de cepas puras, la presencia de fagos infectivos puede ralentizar e incluso detener completamente una fermentación industrial a gran escala, con problemas que van desde productos con características atípicas, de baja calidad o no seguros para su consumo, hasta el descarte de miles de litros de leche. El estudio de fagos de bacterias lácticas permitió conocer que la leche cruda contiene naturalmente fagos, en concentraciones de alrededor de 10^4 unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL), y en plantas lácteas se han reportado hasta 10^8 UFP/m^3 en aire (Atamer y col., 2013).

Título del proyecto: Alternativas para el mejoramiento del perfil de fagorresistencia en cepas de *Streptococcus thermophilus* empleadas como cultivos iniciadores por la industria láctea argentina.

Instrumento: PICT-2019-2019-00400 (Equipos de trabajo de reciente formación).

Año de convocatoria: 2019.

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación.

Director: Mercanti, Diego.

La circulación de suero, salpicaduras, aerosoles, biofilms presentes en superficies de equipos, mal diseño de plantas de producción, desinfección e higiene incorrectas, son factores que favorecen la persistencia y re-contaminación constante con fagos (Verreault y col., 2011; Pujato y col., 2019). La rotación de cultivos alterna el uso diario de cepas con distinta sensibilidad fágica, de modo que un fago determinado no alcance un umbral crítico de concentración donde se evidencien problemas. La sensibilidad/resistencia de cepas a fagos viene dada por diversos mecanismos, cuyo estudio permite seleccionar aquellas cepas más robustas y estables a lo largo del tiempo, en contraste con los métodos empíricos utilizados en un principio, donde no se conocía el mecanismo involucrado. Algunos de estos se conocen desde hace décadas (inhibición de la adsorción, bloqueo de la inyección de ADN, sistemas de restricción/modificación -R/M-, e infección abortiva -Abi-), y otros se descubrieron y estudiaron en los últimos años, como los sistemas CRISPR-Cas, de gran relevancia en numerosas bacterias lácticas, especialmente en *Streptococcus thermophilus*. Esta especie es la más utilizada en nuestro país, no solo para elaborar yogur sino también una amplia variedad de quesos, y la segunda en importancia a escala mundial (Hols y col., 2005). Un locus CRISPR-Cas presente en un genoma bacteriano consta de espaciadores y repeticiones: secuencias cortas, intercaladas entre sí, de longitud definida y constante (CRISPR), y genes codificantes para proteínas asociadas (Cas). Los espaciadores son adquiridos a partir de ADN foráneo, usualmente de fagos, en una primera etapa de la inmunidad CRISPR (adaptación), mediada por proteínas Cas (Barrangou y Horvath, 2012). En una segunda etapa (expresión), se transcriben ARNs pequeños (crRNAs), con fracciones correspondientes a un espaciador y a una repetición. En la tercera etapa (interferencia), los crRNAs guían proteínas Cas con actividad nucleasa hacia la región complementaria del ADN invasor, el cual es entonces reconocido y degradado. Este mecanismo mejora la inmunidad contra fagos sin alterar la performance tecnológica de la bacteria original. En *S. thermophilus*, CRISPR resulta el principal mecanismo de defensa contra fagos; se han reportado 2 sistemas activos (CRISPR1 y CRISPR3), que brindan inmunidad eficiente (Barrangou y col., 2007; Hynes y col., 2016), y han permitido obtener cepas resistentes de *S. thermophilus*, dando origen a una Patente Europea (Barrangou y Horvath, 2012). Dado que cepas y fagos de zonas geográficas alejadas pueden presentar variaciones genéticas, se han caracterizado sistemas CRISPR nativos de cepas locales (Pedrón, 2022) y se han secuenciados genomas de fagos infectivos aislados en nuestro instituto. No obstante, la actividad de un sistema CRISPR depende de las proteínas Cas, número y distribución de espaciadores (entre otros factores), requiriendo validarse la actividad de sistemas CRISPR detectados mediante herramientas moleculares.

OBJETIVOS

Por lo expuesto, el presente trabajo plantea verificar la actividad real de sistemas CRISPR-Cas en cepas de *Streptococcus thermophilus*, mediante enfrentamiento con fagos específicos de esta especie aislados en el INLAIN. En particular, se determinarán espectros de hospedadores (tanto en medio líquido como agarizado) de fagos con genomas secuenciados, contra cepas con sistemas CRISPR-Cas secuenciados. El posterior análisis comparativo de los espectros de hospedadores obtenidos en este trabajo con la correlación espaciadores-protoespaciadores (en cepas y fagos, respectivamente) permitirá inferir si los sistemas CRISPR Cas se encuentran activos en cepas de *S. thermophilus* empleadas en la industria láctea local.

METODOLOGÍA

Se reactivaron stocks (16 h; 37 °C) de cultivos puros de cepas de *Streptococcus thermophilus* almacenados a -80 °C. Se realizó un control de pureza de las cepas mediante estrías en M17 agar y observación en microscopio óptico de contraste de

fases, tanto de colonias como de cultivos crecidos en medio líquido. Los ensayos para determinar espectros de hospedadores se realizaron a partir de cultivos incubados overnight (16 h; 37 °C). Los fagos fueron descongelados (desde -80 °C), propagados y titulados con sus cepas indicadoras respectivas; los stocks de alto título se filtraron (diámetro de poro: 0,45 µM) y almacenaron a 4 °C. Los espectros de hospedadores se determinaron tanto en medio líquido (test de turbidez; caldo M17) como en medio sólido (spot test; agar M17). Test de turbidez: para cada par cepa/fago, se incubaron en paralelo 2 tubos (M17 adicionado con $CaCl_2$ 10 mM: M17-Ca): ambos con un inóculo de cultivo overnight de la cepa, pero solo uno con adición del stock filtrado del fago a ensayar; luego de incubar a 37 °C, aquellos con disminución de turbidez en el tubo con fagos (con respecto al control) se consideraron positivos. Spot test: este ensayo requiere el armado de una doble capa agarizada: la capa inferior es de agar M17, la capa superior tiene 0,6 % de agar (soft agar), $CaCl_2$ (10 mM) y glicina (100 mM), y contiene la cepa ensayada. Se inoculó una gota de la suspensión en alto título del fago a ensayar sobre la capa superior, y se incubó a 37 °C overnight en microaerofilia. La presencia de un halo transparente, indicativo de lisis celular, sobre un fondo turbio o césped bacteriano, indicó un resultado positivo.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Para el espectro de huéspedes se emplearon 53 cepas de *S. thermophilus* y 27 fagos líticos específicos de esta especie, presentes en el cepario del INLAIN. Los nombres de cada cepa y fago se presentan en las **tablas 1 y 2**. Todas las cepas fueron enfrentadas con todos los fagos, tanto en test de turbidez como en spot test.

N°	Nombre de la cepa	N°	Nombre de la cepa
1	Sth 40	28	Sth Alp7
2	Sth 41	29	Sth Adv A
3	Sth 42	30	Sth Adv B
4	Sth 43	31	Sth VEGE A
5	Sth 44	32	Sth VEGE B
6	Sth 45	33	Sth Tan7
7	Sth 46	34	Sth YCXII-1
8	Sth 47	35	Sth YCXII-2
9	Sth 48	36	Sth ALQ
10	Sth 49	37	Sth XII
11	Sth 50	38	Sth XII-1
12	Sth 51	39	Sth 016-1
13	Sth 52	40	Sth Mild-2C
14	Sth 53	41	Sth Sti14
15	Sth 54	42	Sth SC-36C
16	Sth 55	43	Sth WPC-1
17	Sth 56	44	Sth WPC-2
18	Sth 57	45	Sth SAT13-E
19	Sth 58	46	Sth Body
20	Sth 59	47	Sth Mild-1C
21	Sth DFro A	48	Sth SL-y558-S1
22	Sth DFro B	49	Sth 78-N
23	Sth DFro C	50	Sth 84-N
24	Sth Exp A	51	Sth 85-N
25	Sth Exp B	52	Sth 88-N
26	Sth Alp 5	53	Sth 97-N
27	Sth Alp6		

Tabla 1: Cepas de *S. thermophilus* usadas en el presente estudio.

N°	Nombre del Fago
1	Φ T7M2
2	Φ T7M3
3	Φ T7M4
4	Φ YXCII-1
5	Φ YXCII- 2
6	Φ ALQ
7	Φ XII-DM1
8	Φ XII-DM2
9	Φ XII-DM3
10	Φ XII-DM4
11	Φ XII-DG1
12	Φ XIIDG2
13	Φ XII-2
14	Φ XII-3b
15	Φ XII-4
16	Φ XII-5
17	Φ XII-1
18	Φ XII-3a
19	Φ 016-1
20	Φ 016-DG1
21	Φ 016-DG2
22	Φ ST1-2C
23	Φ ST2-2C
24	Φ ST3-2C
25	Φ M2C-11F
26	Φ M1-Sti14
27	Φ M1-Sc36c

Tabla 2: Fagos de *S. thermophilus* usados en el presente estudio.

Los resultados obtenidos tanto en medio líquido como en medio sólido fueron similares; en los pocos casos donde se observaron incongruencias se repitieron los análisis, y para considerar el caso positivo se tomó como referencia la observación de lisis en medio sólido (halo transparente sobre césped de crecimiento bacteriano). De las 53 cepas analizadas, 27 (~51 %) fueron resistentes a los 27 fagos de la colección, mientras que las 26 restantes mostraron diferentes grados de sensibilidad, como es el caso de las cepas Sth DFro B, Sth Exp A, Sth Alp 6 y Sth VEGE B, que fueron lisadas por un solo fago, mientras que Sth Exp B, y Sth XII-1 fueron lisadas por 18 fagos. Desde el punto de vista de la infectividad de los fagos, M13-Expb resultó notablemente más agresivo que los 26 restantes, infectando un total de 11 cepas. Si bien cada cepa analizada tiene al menos 1 sistema CRISPR-Cas, para que posea fagorresistencia a un fago determinado debida a este mecanismo, al menos 1 espaciador de un sistema CRISPR debe poseer total identidad con una región genómica (protoespaciador) en dicho fago. Este análisis se encuentra actualmente en proceso, pero se ha encontrado repetidamente evidencia de que ciertas cepas poseen una elevada resistencia a algunos de los fagos, sin poseer espaciadores específicos que justifiquen dicha inmunidad. Por consiguiente puede concluirse que, al menos en las cepas de *S. thermophilus* analizadas en el presente trabajo, la resistencia a fagos no estaría determinada exclusivamente por la presencia de sistemas CRISPR-Cas, debiendo existir otro mecanismo de fagorresistencia alternativo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Atamer, Z., Meike, S., Neve, H., Heller, K. J. y Hinrichs, J. (2013). Review: Elimination of bacteriophages in whey and whey products. Frontiers in Microbiology, 4, 1-9.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P. y Moineau, S. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 315, 1709-1712.

Barrangou, R. y Horvath, P. (2012). CRISPR: New horizons in phage resistance and strain identification. Annual Review of Food Science and Technology, 3, 143-162.

Hols, P., Hancy, F. Fontaine, L., Grossiord, B. y col. (2005) New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics. FEMS Microbiol. Rev. 29, 435-463.

Hynes, A.P., Labrie, S.J. y Moineau, S. (2016). Programming native CRISPR arrays for the generation of targeted immunity. MBio, 7, 1-4.

Pedrón, L. (2022). Caracterización de Sistemas CRISPR-Cas de cepas regionales de Streptococcus thermophilus. Tesina de Licenciatura en Biotecnología (FBCB, UNL).

Powell, I.B., Broome, M.C. y Limsowtin, G.K.Y. (2011). Cheese. Starter cultures: general aspects. Encyclopedia of dairy sciences (pp. 552-558). Elsevier, Paises Bajos.

Pujato, S.A., Quiberoni, A. y Mercanti, D.J. (2019). Bacteriophages on dairy foods. Journal of Applied Microbiology, 126(1), 14-30.

Spus, M., Li, M., Alexeeva, S., Wolkers-Rooijackers, J.C.M., Zwietering, M.H., Abee, T. y col. (2015). Strain diversity and phage resistance in complex dairy starter cultures. Journal of Dairy Science, 98(8), 5173-5182.

Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G. M., Veillette, M., Masse, D., Lindsley, W. G. y col. (2011). Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. Applied and Environmental Microbiology, 77(2), 491-497.