

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**Fagos autóctonos de *Leuconostoc*:
caracterización, interacción con sus cepas
sensibles e implicancias industriales.**

Lic. Silvina Alicia Pujato

Directora: Dra. Andrea Quiberoni

Co-Directora: Dra. Daniela Guglielmotti

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

2017



A mi familia...

Deseo expresar mi profundo agradecimiento....

❖ A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral), por haberme dado la formación necesaria para poder llevar a cabo este trabajo.

❖ A la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral), y al Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), por haberme permitido realizar mi Tesis en sus instalaciones.

❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca.

❖ A las Dras. Andrea Quiberoni y Daniela Guglielmotti, dos hermosas personas que me acompañaron en este camino, teniéndome infinita paciencia y brindándome todos sus conocimientos. Gracias por trasmitirme ganas de aprender, de superarme; y sobre todo gracias por formar parte de mi vida.

❖ Al Dr. Jorge Reinheimer, director del INLAIN, por haberme permitido formar parte de este excelente grupo de trabajo.

❖ A todo el equipo Fagolandia, gracias por brindarme su desinteresada colaboración para la realización de este trabajo.

❖ A todos mis compañeros del INLAIN, con quienes compartí estos años en un ambiente de trabajo cálido. En especial a la salita de becarios: Aye, Claudia, Guille, Manqui, por las hermosas charlas y los ricos mates.

❖ A Lisandro y a Emma, por escucharme y apoyarme durante todos estos años, por sus consejos y su apoyo.

❖ 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.

❖ A mis amigos....por ser parte de mi vida.

A todos Gracias!!!

Silvi

Los resultados de esta Tesis Doctoral fueron difundidos a través de:

Publicaciones en Revistas Internacionales con referato:

- 1) *Leuconostoc citreum* MB1 as biocontrol agent of *Listeria monocytogenes* in milk (2014). Pujato, S.A.; Quiberoni, A. del L.; Candioti, M.C.; Reinheimer, J.A.; Guglielmotti, D.M. *Journal of Dairy Research* 81: 137-145.
- 2) *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application (2014). Pujato, S.A.; Guglielmotti, D.M.; Ackermann, H.W.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A. del L. *International Journal of Food Microbiology* 177: 81-88.
- 3) Phages of dairy *Leuconostoc mesenteroides*: Genomics and factors influencing their adsorption (2015). Pujato, S.A.; Mercanti, D.J.; Guglielmotti, D.M.; Rousseau, G.; Moineau, S.; Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A. del L. *International Journal of Food Microbiology* 201: 58-65.
- 4) *Leuconostoc mesenteroides* and *pseudomesenteroides* phages: genomics and cross-species host ranges. Pujato, S.A.; Guglielmotti, D.M.; Martínez-García, M.; Quiberoni, A. del L. Mojica, F.J. (2016, en preparación).



ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
1. BACTERIAS LÁCTICAS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA FERMENTATIVA.....	9
2. FUNCIONES DE LOS CULTIVOS INICIADORES.....	10
2.1. PRODUCCIÓN DE ACIDEZ	10
2.2. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS	11
2.3. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	11
2.4. DESARROLLO DE <i>FLAVOR</i>	12
2.5. FORMACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS	12
2.6. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES	13
3. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	14
4. <i>Leuconostoc</i> EN LA INDUSTRIA FERMENTATIVA.....	14
4.1. METABOLISMO DEL GÉNERO <i>Leuconostoc</i>	15
4.2. <i>Leuconostoc</i> EN PRODUCTOS FERMENTADOS.....	16
4.2.1. Productos vegetales	16
4.2.2. Productos lácteos.....	17
4.2.3. Producción de compuestos antimicrobianos	19
5. LOS BACTERIOFAGOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA FERMENTATIVA.....	20
5.1. ESTRUCTURA DE LOS BACTERIOFAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS	21
5.2. CARACTERIZACIÓN DE FAGOS DE BACTERIAS LÁCTICAS.....	23
5.3. CICLOS DE MULTIPLICACIÓN FÁGICA	24
5.4. CICLO LÍTICO.....	25
5.4.1. Adsorción	25
5.4.2. Inyección del ADN fágico.....	25
5.4.3. Biosíntesis y maduración de las partículas fágicas	26
5.4.4. Lisis de la cepa hospedadora	27
5.5. CICLO LISOGÉNICO	28
6. BACTERIOFAGOS DE <i>Leuconostoc</i>	28
7. MECANISMOS DE FAGORRESISTENCIA.....	29
7.1. BLOQUEO DE LA ADSORCIÓN	30
7.2. INHIBICIÓN DE LA INYECCIÓN DEL ADN FÁGICO	31
7.3. RESTRICCIÓN/MODIFICACIÓN (R/M).....	32
7.4. SISTEMAS CRISPR-CAS	34
7.5. INFECCIÓN ABORTIVA (ABI)	37
8. MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES.....	38
OBJETIVOS.....	42

MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1. CEPAS BACTERIANAS.....	44
1.1. CONSERVACIÓN Y REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS	44
1.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE <i>Leuconostoc</i>	45
1.3. <i>RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA - POLYMERASE CHAIN REACTION (RAPD-PCR)</i>	45
2. BACTERIOFAGOS.....	46
3. METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA PARA EL ESTUDIO DE FAGOS DE <i>Leuconostoc</i>	47
3.1. CONSERVACIÓN DE LOS FAGOS.....	47
3.2. PROPAGACIÓN DE LOS FAGOS	47
3.3. TITULACIÓN DE LOS FAGOS	47
4. CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS	48
4.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	48
4.1.1. Extracción del ADN fágico	49
4.1.2. Perfiles de restricción de los fagos	51
4.1.3. Secuenciación de genomas fágicos	51
4.1.4. Purificación del fago Ln-8.....	52
4.1.5. Identificación de proteínas estructurales	54
4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	54
4.3. VIABILIDAD FÁGICA DURANTE LA CONSERVACIÓN.....	55
4.4. VIABILIDAD FÁGICA A DISTINTOS VALORES DE PH	55
4.5. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN TÉRMICA	55
4.6. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN QUÍMICA	56
5. INTERACCIÓN DE <i>Leuconostoc</i> CON SUS FAGOS ESPECÍFICOS.....	57
5.1. INFLUENCIA DEL CATION Ca^{2+} EN EL CICLO LÍTICO DE LOS FAGOS	57
5.2. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE HOSPEDADORES Y EFICIENCIA DE PLAQUEO	57
5.3. CICLOS DE MULTIPLICACIÓN FÁGICA (<i>BURST SIZE</i>)	58
5.4. CARACTERIZACIÓN DE LA ADSORCIÓN	59
5.4.1. Influencia del calcio	60
5.4.2. Influencia de la temperatura	60
5.4.3. Influencia del pH.....	61
5.4.4. Influencia del estado fisiológico celular.....	61
5.4.5. Influencia de la multiplicidad de infección (m.o.i.)	63
5.5. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE RECEPTORES FÁGICOS	63
5.5.1. Caracterización de receptores sobre paredes celulares.....	64
5.5.2. Caracterización de receptores sobre células enteras	67
5.5.3. Ensayos de adsorción	67
6. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS DE <i>Leuconostoc</i>	68
6.1. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO FAGORRESISTENCIA.....	69
6.1.1. Confirmación de la fagorresistencia.....	69
6.1.2. Eficiencia en la recuperación de mutantes fagorresistentes	70
6.1.3. Estabilidad de la fagorresistencia	70

6.1.4. Nivel de fagorresistencia (EOP, <i>Efficiency of Plaquing</i>).....	71
6.1.5. Tasas de adsorción fágica.....	71
6.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES.....	71
6.3. DESARROLLO DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES EN LECHE.....	72
7. ESTUDIO PRELIMINAR DE SISTEMAS CRISPR-CAS EN BAL.....	73
7.1. RELEVAMIENTO DE SECUENCIAS CRISPR EN CEPAS DE <i>Leuconostoc</i> Y <i>Lactobacillus</i> DEL GRUPO <i>casei</i>	73
7.2. DETERMINACIÓN DE LAS SECUENCIAS LÍDER Y PAM.....	74
7.3. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS QUE CONTIENEN EL SISTEMA CRISPR-CAS EN SU ADN CROMOSÓMICO.....	75
7.3.1. Diseño de <i>primers</i> específicos.....	77
7.3.2. Extracción de ADN bacteriano.....	77
7.3.3. Secuenciación y amplificación de la región CRISPR y genes asociados.....	78
7.4. OBTENCIÓN DE DERIVADOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> DEL GRUPO <i>casei</i>	79
7.4.1. Análisis de las regiones CRISPR de los derivados fagorresistentes.....	79
7.5. AISLAMIENTO DE DERIVADOS FAGORRESISTENTES DE <i>Lactobacillus paracasei</i> BL23 CON EL SISTEMA CRISPR-CAS ACTIVO.....	80
7.5.1. Amplificación de la región CRISPR de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	80
7.5.2. Plásmido empleado.....	81
7.5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	82
7.5.4. Ligación de moléculas de ADN.....	82
7.5.5. Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico por electroporación... ..	83
7.5.6. Transformación de <i>Lactobacillus paracasei</i> BL23 con ADN plasmídico por electroporación.....	84
RESULTADOS.....	86
1. IDENTIFICACIÓN Y DIVERSIDAD DE CEPAS DE <i>Leuconostoc</i>.....	86
2. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS.....	87
2.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	87
2.1.1. Perfiles de restricción.....	87
2.1.2. Secuenciación de los genomas fágicos.....	88
2.1.3. Identificación de proteínas estructurales.....	111
2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	113
2.3. VIABILIDAD DURANTE LA CONSERVACIÓN.....	115
2.4. VIABILIDAD FÁGICA A DISTINTOS VALORES DE PH.....	118
2.5. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN TÉRMICA.....	118
2.6. CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN QUÍMICA.....	121
3. INTERACCIÓN DE <i>Leuconostoc</i> CON SUS FAGOS ESPECÍFICOS.....	125
3.1. INFLUENCIA DEL CATION Ca^{2+} EN EL CICLO LÍTICO DE LOS FAGOS.....	125
3.2. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE HOSPEDADORES Y LA EFICIENCIA DE PLAQUEO	126
3.3. CICLOS DE MULTIPLICACIÓN FÁGICA (<i>BURST SIZE</i>).....	130
3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA ADSORCIÓN.....	131

3.4.1. Influencia del calcio	131
3.4.2. Influencia de la temperatura	133
3.4.3. Influencia del pH	133
3.4.4. Influencia del estado fisiológico celular	134
3.4.5. Influencia de la multiplicidad de infección (m.o.i.)	136
3.4.6. Estimación del número de fagos adsorbidos por célula	136
3.5. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE RECEPTORES FÁGICOS.....	137
4. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS DE <i>Leuconostoc</i>	138
4.1. ESTABILIDAD DE LA FAGORRESISTENCIA Y NIVEL DE FAGORRESISTENCIA (EOP, <i>EFFICIENCY OF PLAQUING</i>)	140
4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MUTANTES ESPONTÁNEOS FAGORRESISTENTES.....	140
4.3. TASAS DE ADSORCIÓN FÁGICA	141
4.4. DESARROLLO DE LOS MUTANTES FAGORRESISTENTES EN LECHE	143
5. ESTUDIO PRELIMINAR DE SISTEMAS CRISPR-CAS EN BAL.....	146
5.1. RELEVAMIENTO DE SECUENCIAS CRISPR EN CEPAS DE <i>Leuconostoc</i>	146
5.2. RELEVAMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS CRISPR EN CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> DEL GRUPO <i>casei</i>	146
5.3. DETERMINACIÓN DE LAS SECUENCIAS LÍDER Y PAM.....	151
5.4. RELEVAMIENTO DE CEPAS DE LA COLECCIÓN DEL INLAIN QUE CONTIENEN EL SISTEMA CRISPR-CAS EN SU ADN CROMOSÓMICO	153
5.5. OBTENCIÓN DE DERIVADOS FAGORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> DEL GRUPO <i>casei</i>	155
5.6. AISLAMIENTO DE DERIVADOS DE <i>Lactobacillus paracasei</i> BL23 CON EL SISTEMA CRISPR-CAS ACTIVO.	156
DISCUSIÓN.....	159
CONCLUSIONES.....	180
BIBLIOGRAFÍA.....	183

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abi	Infección abortiva (<i>Abortive infection</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>Adenosine triphosphate</i>)
BAL	Bacterias ácido lácticas
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
°D	Grados Dornic
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EOP	Eficiencia de plaqueo (<i>Efficiency of plaquing</i>)
EPS	Exopolisacáridos
h	horas
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem
LDR	Leche Descremada Reconstituída
MM	Peso Molecular
m.o.i.	Dosis infectiva (<i>Multiplicity of infection</i>)
m.o.i.c.	Dosis infectiva por célula
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
min	minutos
NSLAB	Bacterias lácticas no adicionadas con el fermento (<i>Non Starter Lactic Acid Bacteria</i>)
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador (<i>Protospacer Adjacent Motif</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoeléctrico
RAPD	Amplificación al azar del ADN polimórfico (<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>)
R/M	Restricción/Modificación
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TMG	Tris-Magnesio-Gelatina
UFC	Unidades formadores de colonias
UFP	Unidades formadores de placas
λ	Longitud de onda
Φ	Bacteriofago

MICROORGANISMOS

<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>St.</i>	<i>Streptococcus</i>

A circular, grayscale microscopic image of biological cells, likely bacteria or fungi, showing various cellular structures and textures. The word "RESUMEN" is overlaid in the center in a bold, black, sans-serif font.

RESUMEN

RESUMEN

Leuconostoc es utilizado en la producción de gran variedad de productos lácteos como quesos, cremas, manteca y leches fermentadas, desempeñando un rol esencial en la formación del *flavor* y textura, a través de la producción de compuestos de aroma y gas (CO₂). Específicamente, el empleo de *Leuconostoc mesenteroides* en la elaboración de quesos azules tiene por objeto generar una textura abierta en la masa, lo que posibilita la colonización de *Penicillium roqueforti* y contribuye, además, a la inhibición de mohos contaminantes sensibles a elevadas concentraciones de CO₂.

En nuestro país, no existen reportes de episodios que involucren a fagos de *Leuconostoc*, posiblemente porque las cepas de este género son utilizadas, en muchos casos, como fermentos adjuntos, y el problema podría haber pasado desapercibido o haber sido adjudicado a otros factores. Sin embargo, durante un monitoreo realizado por nuestro grupo en una planta quesera local, fue posible aislar fagos infectivos de las cepas de *Leuconostoc* que forman parte del fermento utilizado para la elaboración de ciertos quesos. Nueve de estos aislamientos (LDG, CHA, CHB, CyC1, CyC2, Ln-6, Ln-7, Ln-8 y Ln-9) fueron materia de estudio durante la presente Tesis.

Los perfiles de restricción obtenidos con XhoI, ClaI, HindIII y EcoRV permitieron agrupar a los fagos en 6 *clusters* distintos y seleccionar uno de cada patrón para los posteriores estudios (LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9). La caracterización molecular de los seis fagos evidenció genomas de ADN lineal de doble cadena, con tamaños que oscilaron entre 26,5 y 28,9 kb y mecanismo de empaquetamiento del ADN genómico del tipo *cos* para todos ellos. De acuerdo a la similitud de las secuencias nucleotídicas, se los clasificó en dos grupos notablemente diferentes. Los genomas de los fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 mostraron una homología mayor al 90 % con diversos fagos que infectan cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Por su parte, el genoma del fago LDG mostró 90 % de homología con fagos infectivos de cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. De acuerdo a sus características morfológicas (cápsides icosaédricas, colas no contráctiles, más o menos rígidas), los seis fagos se incluyeron en la familia *Siphoviridae*.

En cuanto a la resistencia de las partículas fágicas a la congelación (-20 °C y -80 °C), tratamientos térmicos (63 °C, 72 °C, 80 °C y 90 °C) y valores extremos de pH (4 y 11) se observó, en general, una buena viabilidad en las diferentes condiciones. Durante los ensayos

de inactivación con biocidas industriales y de laboratorio, fue notable la resistencia demostrada por algunos fagos (LDG, Ln-7 y Ln-8) frente a NaClO (>1400 ppm cloro activo durante 45 min para inactivación completa).

La determinación del espectro de hospedadores arrojó resultados sorprendentes, ya que todos los fagos fueron capaces de infectar a todas las cepas en estudio, tanto *Leuc. mesenteroides* como *Leuc. pseudomesenteroides*, evidenciándose cuatro patrones de comportamiento distintos frente a los hospedadores, que coinciden con los 4 tipos de fragmentos variables de la proteína de unión al receptor (RBP). En cuanto a los parámetros de multiplicación fágica, se observaron períodos de latencia de entre 29 y 62 min, tiempos de *burst* de entre 54 y 96 min y *burst sizes* de entre 29 y 56 UFP/centro de infección (fagos LDG, CHB, CyC1, Ln-7, Ln-8 y Ln-9) y de 111 UFP/centro de infección para el fago CHA.

Las tasas de adsorción de los viriones a sus respectivas cepas indicadoras fueron superiores al 99 % luego de 5 min de incubación a 30 °C. La etapa de adsorción se completó aún en ausencia de calcio, así como a temperaturas que variaron entre 0 °C y 50 °C, y con valores de pH entre 4 y 9, a excepción de algunos fagos cuya adsorción disminuyó a partir de los 42 °C. Por otro lado, las células no viables fueron capaces de adsorber los viriones, concluyéndose que la adsorción fágica no requeriría de células en estado metabólico activo. La caracterización preliminar de los receptores fágicos sugiere que componentes de origen hidrocarbonado estarían involucrados en esta etapa del proceso infeccioso para todos los fagos investigados.

Se aisló un total de 43 mutantes fagorresistentes a partir de las 6 cepas indicadoras de *Leuconostoc*, utilizando 6 fagos, ya sea de manera individual o conjunta (cóctel). El nivel de fagorresistencia de las variantes obtenidas fue muy bueno, con valores de EOP (*efficiency of plaquing*) muy bajos ($<10^{-8}$) y elevada estabilidad de este fenotipo. Las tasas de adsorción de los fagos sobre las variantes exhibieron cierta diversidad, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de fagorresistencia asociados (que operarían en etapas posteriores) en aquellos mutantes con adsorciones fágicas elevadas.

En la presente Tesis se realizó una búsqueda en distintas bases de datos *online* con el objetivo de comenzar a estudiar el sistema CRISPR en cepas de *Leuconostoc*. Sin embargo, debido a la escasa cantidad de genomas de *Leuconostoc* secuenciados, no fue posible identificar estructuras CRISPR en cepas de este género.

Por otro lado, debido a la elevada disponibilidad de secuencias CRISPR en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* en bases de datos *online* y la relevancia del tema, se decidió iniciar el estudio de los sistemas CRISPR en dichas cepas probióticas. El mismo tuvo como objetivo principal conocer nuevos sistemas CRISPR en BAL y adquirir conocimientos, tanto en herramientas informáticas como en técnicas de biología molecular, para luego estudiar dichos sistemas en cepas de *Leuconostoc*.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten profundizar los conocimientos referidos a fagos de *Leuconostoc*, así como a la fagorresistencia de las cepas hospedadoras, posibilitando el diseño de herramientas y tecnologías para hacer frente a estas infecciones en los ambientes de la industria láctea.

A circular inset showing a grayscale, high-magnification microscopic view of biological structures. The structures appear to be elongated, cylindrical, and textured, possibly representing cells or fibers. The word "SUMMARY" is overlaid in the center of the circle.

SUMMARY

SUMMARY

Leuconostoc is widely used in the dairy industry for the manufacture of cheese, sour cream, buttermilk and fermented milk. The production of aroma compounds and CO₂ plays a key role in flavor and texture development. The use of *Leuconostoc* in blue cheese manufacture specifically allows obtaining an open texture that improves the colonization by *Penicillium roqueforti*. In addition, inhibition of CO₂-sensitive fungi can be obtained.

In our country, no events involving *Leuconostoc* phages have been reported. *Leuconostoc* cultures are principally used as adjunct starters, thus the problem of phage infection could have been unnoticed. However, during a monitoring in a local cheese factory carried out by our work group, infective phages of *Leuconostoc* commercial strains that compose adjunct starters used in some cheese elaborations, were isolated.

Nine of the isolated phages (named LDG, CHA, CHB, CyC1, CyC2, Ln-6, Ln-7, Ln-8 and Ln-9) were studied in this Thesis. *Leuconostoc* phages were grouped in 6 different clusters based on the restriction profiles obtained using XhoI, ClaI, HindIII and EcoRV. One phage belonging to each pattern was selected for further studies (LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 and Ln-9).

All phages contained linear double-stranded DNA genomes, with sizes that ranged between 26.5 and 28.9 kb. The mechanism of packaging of phage genomes was *cos*-type in all cases. Based on similarity of nucleotide sequences, phages were classified in two notably different groups. Complete genomes of phages CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 and Ln-9 showed sequence homology higher than 90 % with phages infecting various strains of *Leuconostoc mesenteroides*, while genome of phage LDG showed 90 % homology with phages infecting *Leuconostoc pseudomesenteroides* strains.

According to their morphological features (icosahedral capsids, noncontractile and more or less rigid tails), *Leuconostoc* phages studied were included into *Siphoviridae* family. Phage particles showed good viability at freezing temperatures (-20 °C and -80 °C), heat treatments (63 °C, 72 °C, 80 °C and 90 °C) and extreme pH values (between 4 and 11). High resistance to industrial and laboratory biocides was observed for phages LDG, Ln-7 and Ln-8. Concentrations higher than 1400 ppm of active chlorine for 45 min were necessary for complete inactivation of viral particles.

Host range studies yielded surprising results, since all studied phages were able to infect both *Leuc. mesenteroides* and *Leuc. pseudomesenteroides* strains. Moreover, four different patterns of behavior towards bacterial hosts, which matched with the four patterns of the variable fragments of the receptor binding protein, were observed.

In regard to phage multiplication parameters, latency periods between 29 and 62 min, burst times between 54 and 96 min, and burst sizes between 29 and 56 PFU/infective center for phages LDG, CHB, CyC1, Ln-7, Ln-8 and Ln-9, were obtained. The burst size for phage CHA was 111 PFU/infective center. Adsorption rates of the virions to their respective indicator strains were higher than 99 % after 5 min of incubation at 30 °C. The adsorption step was completed even in the absence of calcium, at temperatures ranging from 0 °C to 50 °C, and pH values between 4 and 9, except for some phages whose adsorption decreased at 42 °C. Furthermore, non-viable cells were capable of adsorbing phage particles, concluding that phage adsorption does not require an active metabolic state of bacterial cells. Preliminary characterization of phage receptors suggests that carbohydrates components would be involved at this stage of the lytic cycle for all phages investigated.

A total of 43 phage-resistant derivatives were isolated from *Leuconostoc* indicator strains, using 6 phages either individually or in combination (cocktail). Phage-resistant variants obtained showed very low EOP values (*Efficiency of plaquing*) ($<10^{-8}$), and high stability of phage-resistance phenotype. Wide range of phage adsorption rates was exhibited for the phage-resistant derivatives isolated, suggesting the existence of additional resistance mechanisms (operative at later stages) for those mutants with high rates of phage adsorption.

The presence of CRISPR systems on *Leuconostoc* strains was investigated. With this aim, different *online* databases were explored. However, due to the low number of sequenced *Leuconostoc* genomes, CRISPR structures could not be identified in this genus. For this reason, it was not possible to study CRISPR systems on *Leuconostoc* strains. On the other hand, due to the high availability of CRISPR sequences for strains belonging to *Lactobacillus casei* group in *online* databases and, in view of the high importance of strains of this group, it was decided to begin studying CRISPR systems on these probiotic strains. The main objective was acquiring knowledge about CRISPR systems in LAB strains, as well as tools and techniques of molecular biology, for their use in future studies of CRISPR systems in *Leuconostoc* strains.

The results obtained in this study contribute to the knowledge concerning phage infections on *Leuconostoc* strains, and to phage-resistance of host strains, allowing the design of tools and technologies to face phage attacks in dairy industries.

A circular inset showing a grayscale electron micrograph of biological structures, likely a virus or bacteriophage. The central focus is a long, cylindrical, textured structure with a dark, oval-shaped head at one end. Several thin, hair-like appendages extend from the side of the cylinder. In the background, other similar structures are visible, some appearing as smaller, more complex shapes with multiple legs or appendages.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Bacterias lácticas en la industria láctea fermentativa



Figura 1. Elaboración de yogur.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos Gram positivos, microaerófilos, filogénicamente relacionados, que fermentan diversos azúcares produciendo mayoritariamente ácido láctico. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y constituyen la microbiota predominante de alimentos ricos en carbohidratos, proteínas y vitaminas como productos lácteos, carnes, vegetales y cereales. Además, se encuentran

naturalmente en la superficie de las mucosas de animales, por ejemplo el intestino delgado, el colon y la vagina (López-Díaz y col., 2000).

En la industria láctea fermentativa, las BAL componen los cultivos iniciadores (*starters*). Dichos cultivos llevan a cabo los procesos fermentativos durante la elaboración de productos lácteos fermentados como quesos y leches fermentadas (Figura 1). Si bien la microbiota 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., 2016).

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 compuestos de *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 (Surono 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 son el “corazón” de los productos lácteos fermentados (Surono y Hosono, 2011). Éstos deben cumplir ciertos requerimientos primarios para ser utilizados en la industria láctea: ser inocuos (GRAS: *Generally Regarded As Safe*), producir ácido a través de la fermentación de la lactosa, generar compuestos aromáticos y poseer actividad hidrolítica sobre las proteínas de la leche (Ono y col., 1992; Widyastuti y col., 2014). A continuación se detallan las funciones llevadas a cabo por los distintos cultivos iniciadores.

2.1. Producción de acidez

La producción de ácido láctico en leche origina el fenómeno de coagulación, generando un cambio en la textura del producto. A su vez, la acidez generada elimina y previene el desarrollo de microorganismos alterantes o patógenos, determinando así una adecuada calidad microbiológica del producto final (De Angelis y Gobbetti, 2011; Carminati y col., 2016).

La producción espontánea de ácido láctico por parte de las bacterias lácticas cuando utilizan los azúcares como fuente de carbono y energía, es una capacidad sumamente explotada industrialmente. Dicho proceso se trata de favorecer en la elaboración de cualquier producto lácteo fermentado (quesos, yogur, manteca, etc.), pero debe reprimirse durante el almacenamiento de leche cruda destinada a tratamientos industriales por calor (pasteurización y esterilización), ya que un incremento de acidez disminuye su aptitud al tratamiento térmico (Carminati y col., 2016).

2.2. Hidrólisis de proteínas

Las BAL poseen requerimientos nutricionales complejos pues tienen una limitada capacidad de biosíntesis. Necesitan azúcares fácilmente fermentables (fuente de carbono), aminoácidos y péptidos cortos (fuente de nitrógeno), vitaminas del grupo 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, así como 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 (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).

2.3. Actividad lipolítica

Las BAL poseen enzimas esterolíticas/lipolíticas intracelulares capaces de hidrolizar determinados ácidos grasos. Los lípidos juegan un rol importante en el desarrollo de *flavor* en los quesos, actuando como fuente de ácidos grasos libres, los cuales posteriormente pueden ser catabolizados a otros compuestos responsables del aroma y sabor (De Angelis y Gobbetti, 2011).

2.4. Desarrollo de *flavor*

La generación de compuestos de *flavor* en leches fermentadas tiene lugar a través de vías metabólicas complejas, asociadas en general a los metabolismos del citrato y del piruvato. En el caso de las leches fermentadas, estos compuestos son principalmente ácidos orgánicos (láctico y acético), acetaldehído, diacetilo, acetoína y 2,3-butilenglicol. Sin embargo, el impacto en la producción de compuestos de *flavor* en quesos es más complejo debido al catabolismo de lactato y citrato (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. 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* en manteca y ciertos tipos 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, que resultan además perjudiciales para la salud del consumidor (Smit y col., 2005).

2.5. Formación de exopolisacáridos

Algunas BAL producen exopolisacáridos (EPS), que 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 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 el exterior de la célula, lo cual genera una disminución en la producción de acidez y previene la sobreacidificación en leches fermentadas (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Surono y Hosono, 2011; Carminati y col., 2016).

2.6. Producción de compuestos inhibidores

Los ácidos orgánicos provenientes de la fermentación de azúcares son los responsables de la buena calidad microbiológica de los 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 (Carminati y col., 2016).

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 inhibidor, su uso puede resultar problemático en alimentos (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; De Angelis y Gobbetti, 2011).

Algunas cepas son capaces de producir otros compuestos inhibitorios como bacteriocinas. 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 (Cotter y col., 2005; Carminati y col., 2016). 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 poco 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 (Gautam y Sharma, 2009).

3. Clasificación de las bacterias ácido lácticas

De acuerdo a sus características bioquímicas, se clasificó a las bacterias lácticas en dos grupos:

- Homofermentativas: producen piruvato por catabolismo de la glucosa siguiendo la ruta de Embden-Meyerhof y su único producto final es el ácido láctico.
- Heterofermentativas: producen piruvato por catabolismo de la glucosa siguiendo la ruta de las pentosas y originan una mezcla de compuestos, además de ácido láctico, como dióxido de carbono, etanol o ácido acético.

Otro criterio de clasificación de las BAL considera la temperatura óptima de desarrollo, según el cual se agrupan como:

- Bacterias lácticas mesófilas: su temperatura óptima de desarrollo oscila entre 25 °C y 30 °C. Las principales BAL mesófilas utilizadas en la industria pertenecen a los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Franz y col., 2011).
- Bacterias lácticas termófilas: su temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 37 °C y 45 °C, y se incluye en este grupo a los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Craig y col., 1993; Mäyrä-Mäkinen y Brigret, 2004).

4. *Leuconostoc* en la industria fermentativa

Entre las bacterias ácido lácticas se incluye al género *Leuconostoc*, constituido por bacterias de morfología cocoide o cocobacilares, Gram positivas, productoras de gas (CO₂) a partir de azúcares, de compuestos de aroma (diacetilo, acetato y etanol) en productos lácteos, y de dextranos en presencia de sacarosa (Hemme, 2012). Presentan un metabolismo heterofermentativo estricto con formación de ácido D-láctico, ácido acético, etanol y CO₂, son catalasa negativa y no hidrolizan arginina. Estas bacterias se encuentran naturalmente en los vegetales frescos y desde este hábitat natural difunden a diferentes nichos, incluyendo leche cruda y alimentos refrigerados (Dicks y col., 1993; Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

Algunas especies de *Leuconostoc* están también presentes en productos cárnicos envasados (*Leuc. carnosum*) o en soluciones azucaradas (*Leuc. gelidum*) (Ogier y col., 2008). Además, como *starters* puros o mixtos, juegan un papel importante en varios procesos industriales de fermentación que incluyen la producción de salchichas y verduras fermentadas, cereales y lácteos (manteca, crema y quesos) (Buckenhüskes, 1993; Steinkraus, 2002).

La caracterización taxonómica del género *Leuconostoc* ha sufrido algunos cambios que han suscitado la descripción de nuevas especies (Bjorkroth y col., 2000; Antunes y col., 2002; Kim y col., 2003). En 1993, se propuso reclasificar a *Leuconostoc paramesenteroides* como un nuevo género denominado *Weissella* y en 1995 *Leuconostoc oenos* fue reclasificado como el género *Oenococcus* (Collins y col., 1993; Dicks y col., 1995). Actualmente, el género *Leuconostoc* comprende las siguientes especies: *Leuc. mesenteroides* (subespecies *mesenteroides*, *dextranicum*, *cremoris* y *suionicum*), *Leuc. citreum*, *Leuc. carnosum*, *Leuc. fallax*, *Leuc. garlicum*, *Leuc. gasicomitatum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. inhae*, *Leuc. kimchi*, *Leuc. lactis*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. holzapfelii*, *Leuc. palmae* y *Leuc. miyukkimchii* (Hemme, 2012).

4.1. Metabolismo del género *Leuconostoc*

La ausencia de citocromos y de enzimas que participan en el Ciclo de Krebs impide que *Leuconostoc* posea un metabolismo oxidativo. Por lo tanto, estos microorganismos siguen una vía heterofermentativa, obteniendo energía mediante la fermentación de azúcares, produciendo ácido láctico, etanol o acetato y CO₂ (Cogan y Jordan, 1994; Zaunmuller y col., 2006). Las cepas de *Leuconostoc* son capaces de utilizar mono y disacáridos y de catabolizar ciertos polisacáridos (ej. celulosa) (Carr y col., 2002). El citrato y el malato son los principales compuestos hidrocarbonados metabolizados por *Leuconostoc*.

Leuconostoc es un organismo exigente que requiere, además de carbohidratos fermentables, aminoácidos esenciales y vitaminas (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004). Por esta razón, *Leuconostoc* crece pobremente en leche pero su desarrollo es estimulado al agregarse mezclas de aminoácidos, péptidos, extracto de levadura, etc. Este comportamiento indica que este género carece de una adecuada actividad proteolítica (Vedamuthu, 1994; Bellengier y col., 1997a, b; Server-Busson y col., 1999; Nieto-Arribas y col., 2010). Ciertos

aminoácidos como leucina, isoleucina, valina y glutamina son esenciales para todas las especies de *Leuconostoc* (Cogan y Jordan, 1994; Bellengier y col., 1997 a, b; Foucaud y col., 2001; Hemme, 2012) mientras que la necesidad de los demás es variable, aunque alanina no es requerido por ninguna de las especies que lo componen (Hemme, 2012). Su habilidad para utilizar aminoácidos sugiere que este género tiene un gran potencial en la generación de compuestos de *flavor* (Crow y col., 1998; Tavaría y col., 2002; Liu y col., 2003).

4.2. *Leuconostoc* en productos fermentados

A pesar de que su población es a menudo baja (1 %) en comparación con otras bacterias, *Leuconostoc* se encuentra comúnmente asociado a vegetales y a raíces (Mundt, 1970).

Leuconostoc es utilizado en la producción de diversos alimentos (productos vegetales, lácteos fermentados, carnes fermentadas), desempeñando un rol esencial en la formación de aroma y textura (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Hemme, 2012). A continuación se detallan algunos productos fermentados y la función que cumple el género *Leuconostoc* durante su elaboración.

4.2.1. Productos vegetales

La fermentación de vegetales con sal es una práctica tradicional que se utiliza para preservar, otorgar *flavor*, textura y generar alimentos saludables sin agregado de conservantes (Park y Kim, 2012). Las principales bacterias ácido lácticas encontradas en los fermentos vegetales son: *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. leichmanii*, *Lb. salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus* y *Enterococcus faecalis*, que son clasificadas como homofermentantes; *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. dextranicum*, *Weissella* sp., *Lb. cellobiosus*, *Lb. brevis* y *Lb. fermentum*, que se clasifican como heterofermentantes; y *Lb. plantarum* y *Lb. sake*, clasificadas como heterofermentantes facultativos (Ray y Bhunia, 2008).

Los vegetales fermentados como el chucrut, los pepinos salados, el kimchi y el kocho involucran un sistema muy complejo de microorganismos y procesos bioquímicos, enzimáticos,

químicos y físicos (Ennahar y col., 2003). En el chucrut, la fermentación es iniciada por bacterias aerobias (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*), pero luego continúa por acción de bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc* y *Lb. plantarum*, que se convierten en la microbiota dominante (Holzapfel y col., 2008). El kimchi es un alimento coreano muy popular a base de repollo y/o rábano aunque también pueden utilizarse otros vegetales. El producto es fermentado en tiempos relativamente cortos y almacenado a 4 °C durante 3 semanas o a 15 °C durante 4 días (Surh y col., 2008). A bajas temperaturas, la BAL predominante es *Leuconostoc*; sin embargo, a temperaturas superiores predominan cepas de *Lactobacillus* (Park y Kim, 2012).

Leuconostoc también está involucrado en la fermentación de kocho. Este producto, considerado como probiótico, es elaborado en Etiopía a base de un vegetal rico en almidón. En el comienzo de la fermentación, la microbiota dominante es *Leuc. mesenteroides*, aunque luego de una semana los lactobacilos alcanzan un número importante. *Leuconostoc* es la BAL dominante en este producto junto con *Weissella minor*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lb. plantarum* (Mäki, 2004; Molin, 2008).

En la fermentación de pepinillos salados, *Leuconostoc* es la primera bacteria láctica que desarrolla, pero luego es reemplazada por *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Los pepinillos son utilizados en la elaboración de diferentes preparados de pickles (Mäki, 2004; Park y Kim, 2012).

4.2.2. Productos lácteos

Diversas cepas de *Leuconostoc* están presentes en una gran variedad de productos lácteos como quesos, manteca y leches fermentadas. A su vez, están presentes en una amplia variedad de quesos artesanales europeos elaborados a partir de leche cruda (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

Durante la elaboración de productos lácteos, *Leuconostoc* puede ser adicionado como cultivo adjunto acompañando a otros microorganismos (Carminati y col., 2016). *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* o *Leuc. lactis* son especies utilizadas tradicionalmente para la elaboración de manteca (Vedamuthu, 1994), o pueden ser parte de la microbiota natural del alimento fermentado (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Hemme, 2012).

Las principales funciones que cumple el género *Leuconostoc* en los distintos productos lácteos son: (a) producción de gas en quesos con ojos, y (b) producción de compuestos de *flavor* (Server-Busson y col., 1999; Hemme, 2012).

a) Producción de gas en quesos con ojos

Un papel muy importante que cumplen las bacterias del género *Leuconostoc* en la producción de determinados quesos, es la generación de CO₂ que conduce a la formación de ojos. En quesos de tipo suizo (Edam, Gouda) el desarrollo de *Leuconostoc* genera la formación de ojos pequeños (menores de 1 cm de diámetro) y redondos. Por otra parte, en la elaboración de quesos azules se utilizan cultivos iniciadores que contienen cepas de este género productoras de grandes cantidades de gas (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) (Figura 2). Esto tiene por objeto generar una textura abierta en la cuajada que posibilita la colonización de *Penicillium roqueforti* contribuyendo, además, a la inhibición del crecimiento de mohos contaminantes sensibles a elevadas concentraciones de CO₂ (Menéndez y Rodríguez-Otero, 2000; Nieto-Arribas y col., 2010). Sin embargo, la producción de gas por parte de *Leuconostoc* no es bienvenida en quesos de masa cerrada o “ciega”, ya que conduce al detrimento de la calidad del producto. Esto ha constituido una enorme problemática en nuestra zona, en donde se ha registrado, en los últimos años, este fenómeno en los procesos de manufactura de quesos (Quiberoni y col., 2008).



Figura 2. Queso azul.

b) Desarrollo de compuestos de *flavor*

Dado que *Leuconostoc* desarrolla pobremente en leche, se lo emplea en cultivos iniciadores mixtos junto con cepas del género *Lactococcus* para estimular la producción de compuestos de *flavor* (Server-Busson y col., 1999; Nieto-Arribas y col., 2010). *Leuconostoc* utiliza lactosa y citrato generando CO₂, diacetilo, acetoína, acetato, etanol y 2,3-butilenglicol, los cuales son importantes para el desarrollo adecuado del aroma y sabor de los productos

lácteos fermentados (Vedamuthu, 1988; Macedo y Malcata, 1997; Hemme, 2012). Esta reacción se produce bajo determinadas condiciones biológicas y ambientales (pH, concentración de azúcar y de citrato, aireación durante el crecimiento) (Schmitt y Diviès, 1991; Hugenholtz, 1993). Cabe aclarar que el citrato es consumido tanto en medios ácidos como neutros pero sólo se producen acetoina y diacetilo a pH ácido (Schmitt y col., 1997).

4.2.3. Producción de compuestos antimicrobianos

Al igual que otras BAL, *Leuconostoc* produce sustancias antimicrobianas que son aprovechadas en la industria alimenticia para evitar el desarrollo de microorganismos alterantes o patógenos. De hecho, se las utiliza para preservar carnes, productos lácteos, jugos de frutas y vegetales fermentados (Ruiz-Barba y col., 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Hemme, 2012).

Como producto de la fermentación de los componentes hidrocarbonados de la leche se generan ácidos orgánicos, principalmente láctico y acético. Estos ácidos son capaces de inhibir el desarrollo de muchos microorganismos, ya que modifican las propiedades de la membrana afectando la integridad celular. En presencia de oxígeno, *Leuconostoc* produce y acumula peróxido de hidrógeno, ya que carece de la enzima catalasa que es la responsable de la degradación. Este compuesto podría inhibir ciertos microorganismos (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

Por otro lado, ciertas cepas de *Leuconostoc* son capaces de generar sustancias denominadas bacteriocinas. Como se detallara anteriormente, las bacteriocinas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas o péptidos antibacterianos activos generalmente contra un rango limitado de organismos relacionados con la cepa productora (Klaenhammer, 1988; Todorov, 2010). Existen muchos trabajos que reportan el aislamiento y caracterización de distintas bacteriocinas producidas por *Leuconostoc*, especialmente de Clase II, que inhiben el desarrollo de *Listeria monocytogenes* (Pujato y col., 2014b). También se han encontrado bacteriocinas en verduras y frutas frescas, capaces de inhibir otras BAL (Trias y col., 2008).

5. Los bacteriofagos en la industria láctea fermentativa

Los fagos son virus que infectan bacterias (Figura 3). Ellos se propagan a expensas de las cepas sensibles, utilizando la maquinaria biosintética de la célula (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).

Los fagos que infectan bacterias lácticas han sido aislados de diversas matrices alimentarias (leche cruda, yogur, quesos, vegetales, cereales, vinos, café) así como también de aguas residuales, saliva y vagina (Rodríguez González y col., 2010). Sin embargo, uno de los sectores industriales más afectado por las infecciones fágicas es el de la industria láctea fermentativa. En general, el proceso de fermentación comienza a verse comprometido cuando la concentración de partículas fágicas es de aproximadamente 10^4 UFP/ml, aunque esto dependerá de cada planta industrial en particular y de cada proceso de elaboración. Cuando la concentración fágica alcanza valores superiores a 10^4 UFP/ml, el proceso de fermentación puede ser complementamente inhibido, y el producto carecerá de las características deseadas. Para minimizar las infecciones fágicas, 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; Briggiler Marcó y col., 2012).

Entre los fagos de bacterias lácticas, aquellos específicos de *Lactococcus* y de *St. thermophilus* son los mayormente aislados, debido a que estas bacterias son las más utilizadas en los procesos fermentativos industriales. Es así que sus fagos específicos han sido ampliamente estudiados y caracterizados (Emond y Moineau, 2007; Quiberoni y col., 2010). Sin

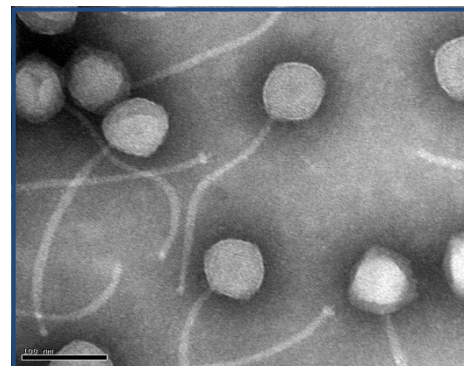


Figura 3. Microscopía electrónica de fagos de BAL.

embargo, también se han aislado fagos de diferentes ambientes que infectan diversas especies de *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. helveticus*) (Josephsen y Neve, 2004; Quiberoni y col., 2011) y de *Leuconostoc* (Josephsen y Neve, 2004; Atamer y col., 2011; Pujato y col., 2014a).

La principal fuente de entrada de fagos a los ambientes lácteos es la leche cruda. Estos pueden propagarse rápidamente y alcanzar altos niveles en poco tiempo, pudiendo diseminarse por todo el ambiente industrial (Moineau y col., 2002; Briggiler Marcó y col., 2012), conduciendo a una inhibición total o parcial de las fermentaciones. Por el gran riesgo económico que esto implica, ante la presencia de una infección fágica se debe conocer la extensión del problema, identificar la ecología de fagos en los ambientes industriales y 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; Suárez y col., 2012).

5.1. Estructura de los bacteriofagos de bacterias lácticas

Básicamente, cada partícula fágica se compone de un genoma relativamente pequeño, lineal o circular, de ADN o ARN de simple o doble cadena, rodeado por una cubierta proteica. La misma está formada por un ensamblado simétrico de subunidades morfológicamente idénticas, las que a su vez pueden estar compuestas por un número de unidades aún más pequeñas (moléculas individuales o un grupo de moléculas). La cubierta proteica en su conjunto se denomina cabeza o cápside y las subunidades proteicas, capsómeros. La partícula vírica puede o no poseer cola (contráctil o no), apéndices unidos, y estar o no recubierta por una envoltura lipídica (virus envueltos). La cola tiene secciones de longitud variable y puede tener collares, vainas y placa basal; esta última es una estructura compleja adicional que puede o no estar presente y tiene por función el anclaje del fago a la célula hospedadora, para lo cual puede además presentar fibras (Hassan y Frank, 2001). La partícula viral completa e infectiva se conoce

como virión y existe una gran variedad de formas y tamaños.

De acuerdo con el *International Committee on Taxonomy of Viruses*, todos los fagos conocidos de BAL pertenecen al orden *Caudovirales*. Los fagos incluidos en este orden poseen un genoma de ADN lineal de doble cadena, cabeza isométrica o prolata y cola (Figura 4). Los fagos se fijan al huésped por su cola, a través de la cual el ADN es inyectado al citoplasma de las bacterias.

Los fagos de bacterias lácticas pueden agruparse en base a la clasificación propuesta por Ackermann (2009) en tres familias (Figura 5):

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.

Teniendo en cuenta esta clasificación, la mayoría de los fagos de BAL pertenecen a la familia *Siphoviridae* (Rodríguez González y col., 2010; Quiberoni y col., 2011; Capra y col., 2016).

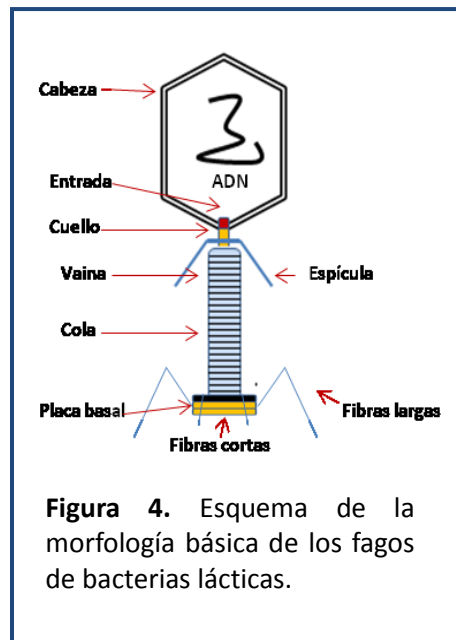


Figura 4. Esquema de la morfología básica de los fagos de bacterias lácticas.

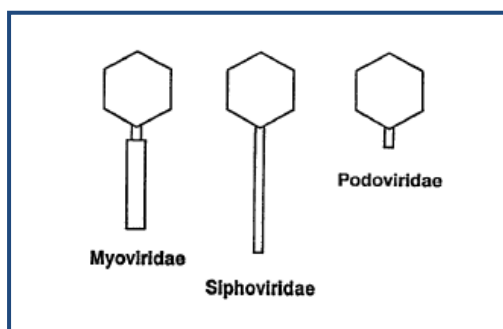


Figura 5. Clasificación de las familias de fagos de bacterias lácticas propuesta por Ackermann (2009).

5.2. Caracterización de fagos de bacterias lácticas

Debido a los problemas derivados de las infecciones fágicas, existe gran interés en conocer las fuentes a través de las cuales los fagos ingresan al ambiente industrial, entender los mecanismos de interacción con las cepas sensibles y encontrar soluciones para lograr un exitoso proceso de fermentación (Lyne, 2011). Para ello, los fagos pueden ser caracterizados mediante el estudio de diversas propiedades:

Morfología: a través de técnicas de microscopía electrónica es posible determinar las características morfológicas de los fagos (forma y dimensiones de la cápside y de la cola), así como también la presencia de estructuras típicas: collar, placa basal, fibras, entre otras (Ackermann, 2009).

Rango de hospedadores: es el patrón de lisis de un bacteriofago particular cuando se enfrenta a una variedad de cepas. Resulta 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.

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 la cápside y de la cola, y un conjunto más o menos grande de proteínas estructurales minoritarias. Los perfiles proteicos obtenidos resultan similares para fagos morfológicamente relacionados (Carlson, 2005).

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

Secuenciación: A través del análisis detallado de las secuencias genómicas, es posible determinar el tamaño exacto del genoma y el porcentaje de GC. A su vez, el estudio de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de los genomas fágicos, puede aportar información sobre su biología, evolución, transferencia vertical y horizontal de genes, diversidad genética y ciclos lítico/lisogénico. 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 (Lu y col., 2005; Rihtman y col., 2016).

5.3. Ciclos de multiplicación fágica

Los bacteriofagos se multiplican a través de los ciclos lisogénico o lítico a expensas de la célula bacteriana hospedadora (Figura 6).

Durante el ciclo de infección lisogénico, el ADN viral se integra al cromosoma 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 se encuentra en estado inactivo dentro de la célula, denominándose profago o fago temperado (Capra y col., 2016). Por otro lado, durante un ciclo lítico, los fagos infectan y lisan a la cepa hospedadora con la posterior liberación de la progenie fágica. Estos fagos reciben el nombre de líticos o virulentos.

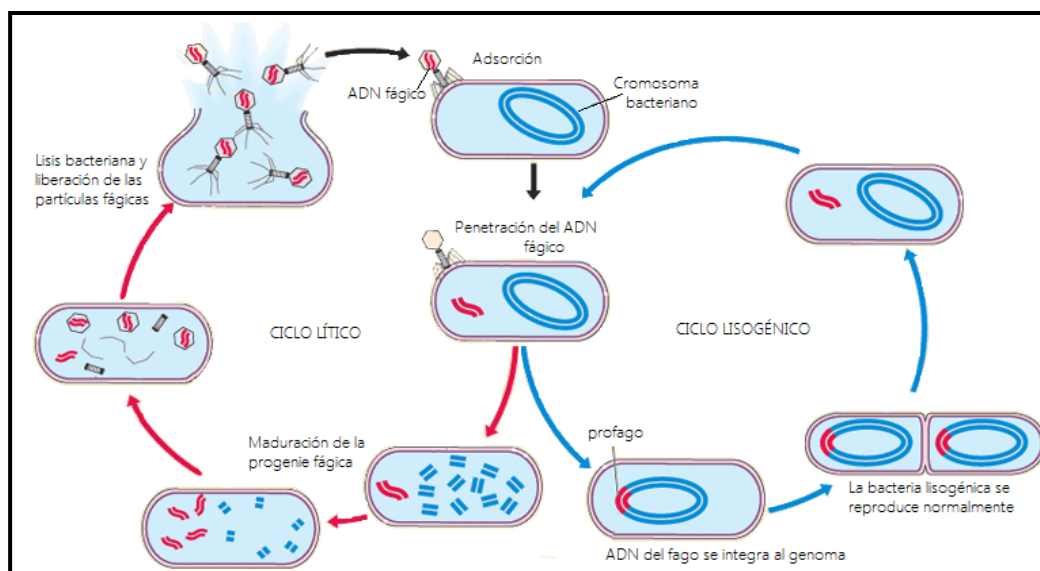


Figura 6. Ciclos lítico y lisogénico de un fago (modificada de Tortora y col., 2010).

5.4. Ciclo lítico

El ciclo de multiplicación fágica tiene cuatro etapas: adsorción, inyección del ADN fágico, biosíntesis y maduración de las partículas fágicas y lisis de la célula bacteriana. A continuación se describe cada una de las etapas.

5.4.1. Adsorción

El ciclo lítico se inicia con la adsorción del fago a receptores ubicados en la superficie (pared celular) de una bacteria sensible, denominada “hospedadora”. 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 (Guglielmotti y col., 2012a).

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).

La velocidad y eficiencia de la adsorción varían para cada sistema cepa-fago y dependen de factores externos como temperatura, pH, presencia de cationes divalentes (como Ca^{2+} o Mg^{2+}) y del estado fisiológico celular (Capra y col., 2016). En particular, 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).

5.4.2. Inyección 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 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 peptidoglicano y la membrana interna de la célula. Posteriormente, se liberan ciertos mecanismos que bloqueaban la salida del ADN desde la cápside, produciéndose la inyección del ADN al interior de la célula bacteriana (Guttman y col., 2005).

Generalmente, la inyección del ADN fágico requiere la presencia de cationes divalentes (principalmente Ca^{2+}) y en algunos casos, energía celular (ATP) (Guglielmotti y col., 2012). Los cationes divalentes podrían actuar como contraiones durante la translocación del ADN a través de la membrana celular (Josephsen y Neve, 2004).

5.4.3. Biosíntesis y maduración de las partículas fágicas

Poco después de la inyección del ADN viral, se detiene la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas de la célula bacteriana hospedadora 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 al 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 empaca en forma condensada en las cápsides. En uno de los vértices de la cápside hay un complejo proteico que sirve como punto de inicio para el ensamblaje de la misma, 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 cápside para dar lugar a la partícula viral completa (Josephsen y Neve, 2004; Guttman y col., 2005; Guglielmotti y col., 2012).

5.4.4. Lisis de la cepa hospedadora

El ciclo lítico se completa cuando la progenie fágica es liberada del interior de la célula hospedadora hacia el medio ambiente. En esta etapa participan dos enzimas codificadas en el genoma fágico denominadas 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 peptidoglicano de la pared celular bacteriana. 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).

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 unidades formadoras 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 se lisan (*rise time*). Cuando todas las células infectadas se 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*. Estos parámetros varían de acuerdo al sistema estudiado y pueden estar influenciados por factores experimentales (pH, temperatura, etc.), el estado nutricional del hospedador y la disponibilidad de electrolitos (Briggiler Marcó y col., 2015).

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 el contrario, si

el ciclo demanda tiempos prolongados, se verán disminuidas las oportunidades para la infección y nuevos ciclos de reproducción (Guttman y col., 2005).

5.5. 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 lisogénico y lítico recibe el nombre de inducción lisogénica y ocurre como respuesta a daños sufridos en el ADN bacteriano (Rodríguez González y col., 2010). Entre los factores que pueden provocar esta transición se encuentran la luz solar, la presencia de peróxido de hidrógeno y los cambios de temperatura, aunque los más eficaces son la mitomicina C y la radiación UV-C (254 nm) (Weinbauer, 2004).

6. Bacteriofagos de *Leuconostoc*

Los fagos de *Leuconostoc* se encontraron por primera vez en una fábrica de azúcar en 1947 (Leiva-Quiros y McCleskey, 1947). También se aislaron de sake (bebida fermentada a base de arroz) en 1955 (Kaneko y col., 1955), y en 1971 de productos cárnicos refrigerados (Whitman y Marshall, 1971). Por otro lado, en productos lácteos se detectaron por primera vez en 1978 (Sozzi y col., 1978). Shin y Sato (1979) demostraron que los fagos de *Leuconostoc* estaban ampliamente distribuidos entre varios productos lácteos, e identificaron fagos de *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* en queso azul, Camembert, queso Cottage, queso crema, queso Edammer, queso Gouda y leche cruda. Años más tarde, se aislaron otros fagos de *Leuconostoc* a partir de viili, un producto lácteo fermentado de origen escandinavo (Saxelin y col., 1986), así

como de otros productos lácteos como quesos, mantecas (Neve y col., 1988; Boizet y col., 1992; Atamer y col., 2011) y en muestras de suero de leche (Davey y col., 1995).

Con respecto a estudios moleculares, hasta el momento se conoce la secuencia genómica de dieciocho fagos de *Leuconostoc* (Jang y col., 2010; Lu y col., 2010; Kleppen y col., 2012; Kot y col., 2014; Pujato y col., 2015), de los cuales seis fueron secuenciados en el marco de esta Tesis. El tamaño de los genomas osciló entre 25,7 y 38,7 kb, y el contenido de GC entre 36,1 y 38,7 % (Lu y col., 2010; Kleppen y col., 2012; Ali y col., 2013; Kot y col., 2014; Pujato y col., 2015).

Muchos de estos fagos de *Leuconostoc* han sido reportados como responsables, no solamente de comprometer la actividad de los *starters* ocasionando detrimento de los productos fermentados y acarreando las consecuentes pérdidas económicas, sino de inhibir selectivamente bacterias bacteriocinogénicas beneficiosas que compiten con bacterias indeseables y patógenas en alimentos (Greer y col., 2007). En nuestro país, y previo a nuestros estudios, no existían datos reportados acerca de episodios que involucraran fagos de *Leuconostoc*, posiblemente porque las cepas de este género son utilizadas como fermentos adjuntos, y el problema podría haber pasado desapercibido o haber sido adjudicado a otros factores. Sin embargo, durante un monitoreo realizado por nuestro grupo en una planta quesera local, fue posible detectar la existencia de fagos de *Leuconostoc* capaces de atacar cepas que forman parte del fermento utilizado para procesos de elaboración de ciertos quesos (Pujato y col., 2014a; 2015). Los fagos específicos de *Leuconostoc* aislados durante el mencionado monitoreo, fueron materia de estudio durante la presente Tesis.

7. Mecanismos de fagoresistencia

Las bacterias lácticas han estado expuestas al ataque de los fagos a lo largo de toda su historia, por lo que han desarrollado diversos sistemas de defensa contra los mismos. En respuesta, los fagos también evolucionaron y desarrollaron sistemas de contradefensa para sortear esas barreras (Neve, 1996; Quiberoni y col., 2011; Capra y col., 2016). El descubrimiento de mecanismos naturales de defensa bacteriano frente a las infecciones fágicas, ha permitido que sean utilizados en programas de mejoramiento de cepas que forman parte de cultivos

iniciadores. Los cultivos de *Lc. lactis* y *St. thermophilus* han sido utilizados más intensivamente y en mayor escala que otras bacterias lácticas, y consecuentemente han estado expuestos en mayor medida a sufrir infecciones por fagos. Por las mismas razones, han sido más extensamente estudiados (Capra y col., 2016). La identificación y caracterización de estos sistemas ha permitido clasificarlos en cinco grupos principales en base a su modo de acción: Bloqueo de la adsorción, Inhibición de la inyección del ADN fágico, Restricción/Modificación (R/M), Sistemas CRISPR-Cas e Infección abortiva (Abi). A continuación, se describe brevemente el mecanismo de acción de cada uno de estos sistemas de defensa bacteriana frente al ataque de fagos.

7.1. Bloqueo de la adsorción

El bloqueo de la adsorción es un término usado para describir la resistencia que deriva del fracaso de una partícula fágica de unirse a la superficie de una célula bacteriana. Esta interferencia o inhibición de 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 modificar 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 7A) (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 entre el fago y la superficie celular, ya sea enmascarando al receptor o bien uniéndose a él (Rousseau y col., 2012). 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, que pueden estar unidas a partículas fágicas o bien como enzimas solubles libres provenientes de las células lisadas (Figura 7B) (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, dejándolos no disponibles para las partículas fágicas (Labrie y col., 2010).

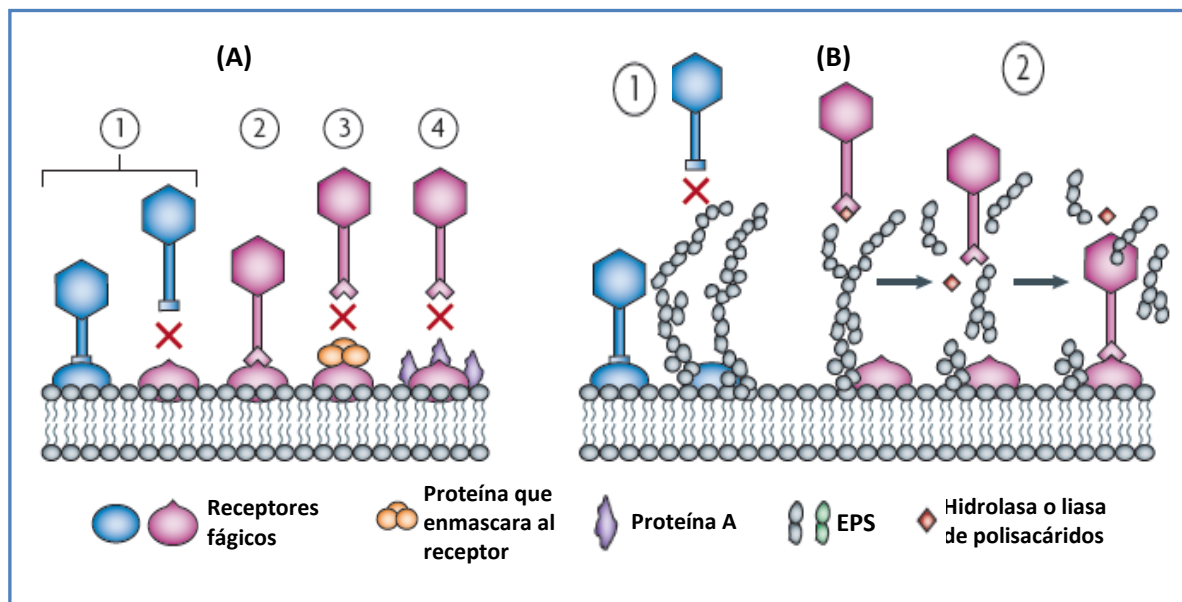


Figura 7. Estrategias utilizadas por las bacterias para impedir la adsorción fágica. **A)** Bloqueo de los receptores fágicos. La bacteria puede adquirir resistencia a través de la modificación de sus receptores fágicos (1); sin embargo los fagos pueden evolucionar para reconocer los nuevos receptores (2). La bacteria también puede producir proteínas que enmascaren a los receptores (3 y 4). **B)** Producción de exopolisacáridos (EPS) que impiden la unión a los receptores (1). Sin embargo, las enzimas hidrolasas y liasas pueden degradar los EPS permitiendo la unión receptor-fago (2) (modificada de Labrie y col., 2010).

7.2. Inhibición de la inyección del ADN fágico

Hasta el momento, se identificaron y estudiaron pocos sistemas de fagorresistencia bacteriana que presenten este tipo de mecanismo. 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, participa generalmente 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 8) (Labrie y col., 2010).

Estos sistemas fueron estudiados principalmente en *Lc. lactis* y posteriormente se han encontrado y caracterizado en *St. thermophilus* (Capra y col., 2016).

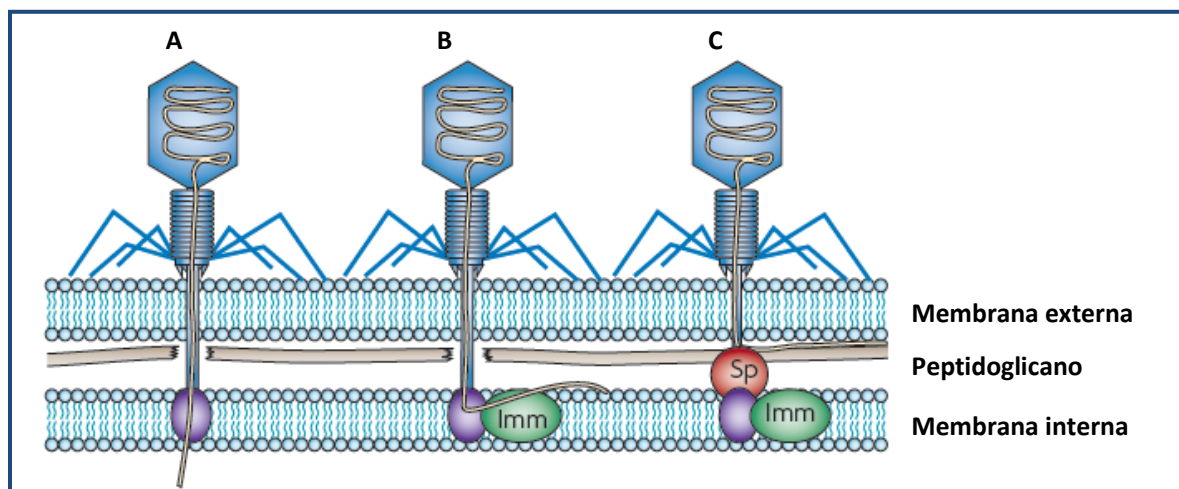


Figura 8. Inhibición de la inyección del ADN fágico al interior de la célula. **A)** Infección fágica normal. La capa de peptidoglicano es degradada y una proteína asociada a la membrana interna participa en el pasaje del ADN fágico hacia el interior celular. **B)** La proteína Imm codificada en el genoma del fago T4 evita la entrada del ADN al citoplasma. **C)** La proteína Sp (fago T4) bloquea la degradación del peptidoglicano y retiene el ADN fágico entre éste y la membrana celular externa (modificada de Labrie y col., 2010).

7.3. 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 9). En este proceso 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 (Rousseau y col., 2012). La metilación se realiza sobre una adenina o una citosina localizada dentro de la secuencia de reconocimiento y por transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina. El clivaje se produce dentro o cerca del sitio de reconocimiento o bien ocurre 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).

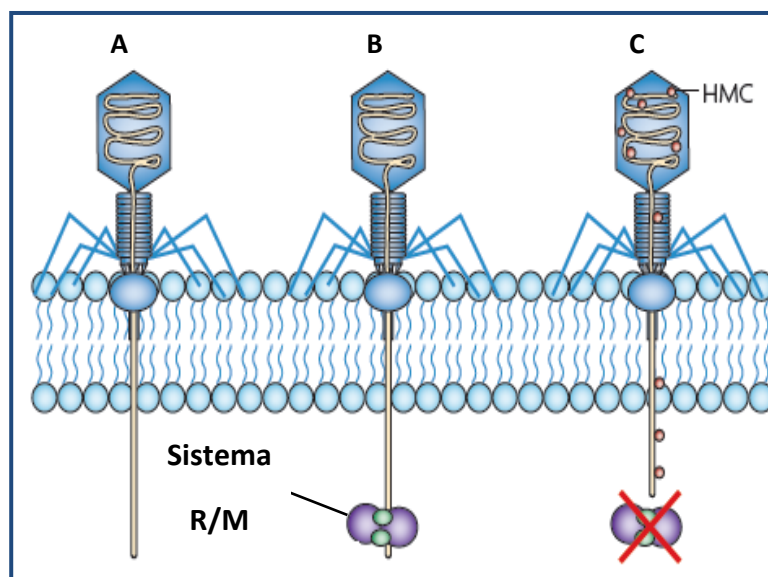


Figura 9. Mecanismo de Restricción/Modificación (R/M). **A)** Infección fágica normal. **B)** La partícula fágica infecta a una cepa resistente que contiene sistemas del tipo R/M. El genoma fágico es clivado en sitios específicos por enzimas de restricción. **C)** El genoma fágico contiene hidroximetilcitosina (HMC), por lo tanto puede metilarse y vencer al sistema R/M (modificada de Labrie y col., 2010).

La ventaja de los sistemas R/M es que finalizan la infección antes de que la célula se muera o se dañe por acción de los fagos (Sturino y Klaenhammer, 2004). Sin embargo, no resultan muy eficientes, aunque sí lo son en combinación con otros (Rousseau y col., 2012). Estos sistemas pueden estar codificados tanto en plásmidos (*Lactococcus*) como en el cromosoma (*St. thermophilus*) (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 9) (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 (Rousseau y col., 2012). 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).

7.4. Sistemas CRISPR-Cas

Es el mecanismo de fagorresistencia más recientemente evidenciado en procariontes. En referencia a BAL, hasta la fecha fue demostrado en *St. thermophilus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. crispatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius* y *Lb. reuteri* (Garneau y Moineau, 2011; Oh y van Pijkeren, 2015), aunque solamente ha sido estudiado en detalle en *St. thermophilus* (Horvath y Barrangou, 2010; Horvath y col., 2012).

Los sistemas CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* - repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) -Cas (proteínas asociadas al CRISPR) otorgan inmunidad heredable y flexible frente a fagos. Dichos sistemas están formados por un arreglo CRISPR y un operón de genes *cas* (Figura 10) (Burstein y col., 2016). Los arreglos CRISPR consisten en secuencias de ADN repetitivas, cortas y altamente conservadas (*repeats* o repeticiones), intercaladas con secuencias variables llamadas espaciadores o *spacers*. Estos espaciadores, provenientes típicamente de fragmentos genéticos (protoespaciador) foráneos tales como plásmidos o virus, son incorporados en los sistemas CRISPR durante el proceso de infección (Horvath y col., 2008; Barrangou y Horvath, 2012), lo cual otorga inmunidad para la bacteria. Adyacente a dicho arreglo, aparece una secuencia denominada 'líder' donde se localiza el promotor responsable de la transcripción de esta región para generar un transcripto denominado pre-crRNA. El operón que contiene los genes *cas* codifica un amplio y heterogéneo grupo de proteínas con dominios funcionales típicos de nucleasas, helicasas, polimerasas y proteínas asociadas a polinucleótidos (Labrie y col., 2010).

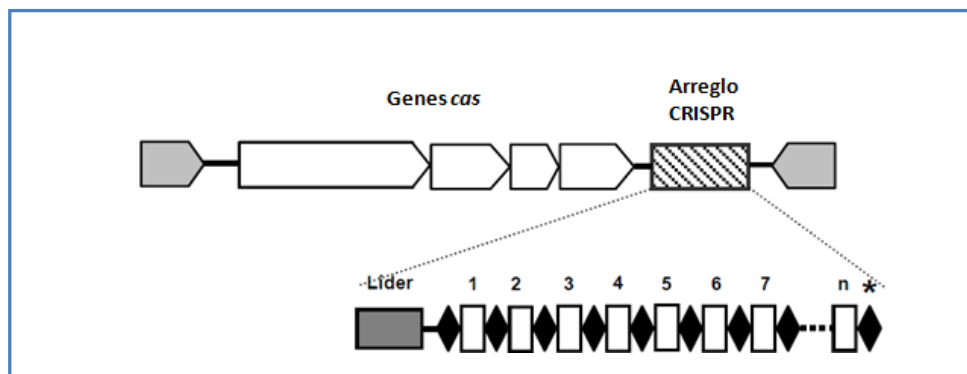


Figura 10. Esquema simplificado de un sistema CRISPR-Cas. Las repeticiones están representadas como diamantes, los espaciadores como rectángulos y el asterisco indica la repetición terminal (modificada de Carminati y col., 2016).

A pesar de que el mecanismo de acción no se ha caracterizado completamente, este puede dividirse en dos etapas: Proceso de Adquisición del ADN foráneo (Figura 11A) y Proceso de Inmunidad (Figura 11B).

Proceso de Adquisición del ADN: cuando una cepa fago-sensible se enfrenta a fagos virulentos, se producirá el desarrollo de derivados espontáneos fagoresistentes. Como consecuencia de la interacción cepa/fago, los derivados incorporan a su cromosoma las secuencias espaciadoras provenientes del material genético del fago en el extremo 5' de un arreglo CRISPR, lo que le otorga resistencia frente a dicho fago. En algunos casos, los derivados pueden adquirir diversos espaciadores del mismo genoma fágico (Horvath y Barrangou, 2010). Las proteínas Cas juegan un rol importante en el reconocimiento del ADN extraño y su incorporación al genoma bacteriano (Horvath y Barrangou, 2010). El mecanismo molecular a través del cual se incorporan las secuencias espaciadoras al genoma bacteriano es desconocido. Sin embargo, actualmente se sabe que en el genoma fágico existe una secuencia nucleotídica corta, conservada, denominada motivo adyacente al protoespaciador (PAM - *Protospacer Adjacent Motif*), cercana a la secuencia nucleotídica que incorporará la bacteria. La secuencia y la ubicación de la secuencia PAM varía entre los distintos sistemas CRISPR-Cas (Seed y col., 2013). Cabe señalar que el protoespaciador es la secuencia idéntica al espaciador, pero que se encuentra en el genoma fágico.

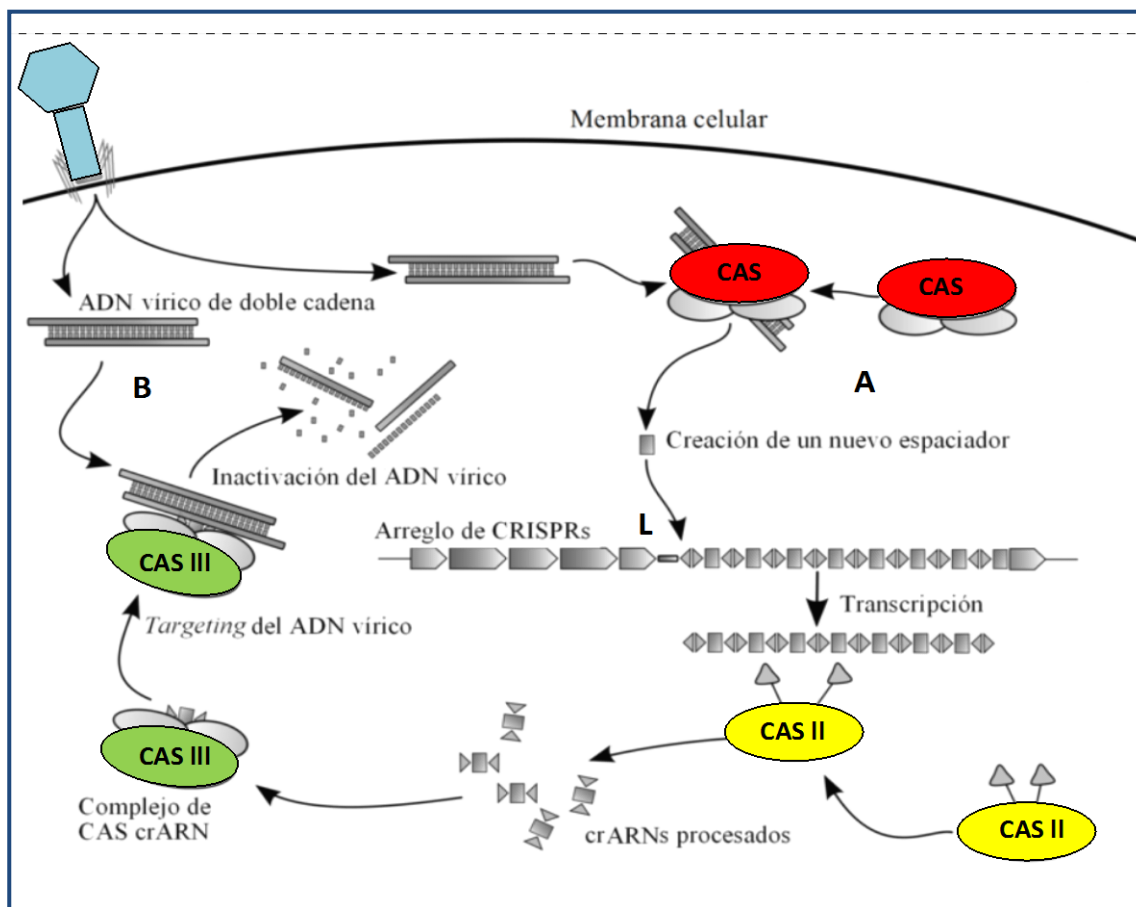


Figura 11. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas. **A)** Proceso de Adquisición: luego de la inyección del ADN foráneo, un complejo Cas reconoce dicho ADN extraño e integra una nueva unidad de repetición-espaciador en el extremo líder del arreglo CRISPR. **B)** Proceso de Inmunidad: la región CRISPR formada por repetición-espaciador se transcribe en un pre-crRNA, el cual es procesado a crRNAs maduros, que forman un complejo con las proteínas Cas e interfieren con el ácido nucleico invasor. Las repeticiones están representadas como diamantes, los espaciadores como rectángulos, y la secuencia líder de CRISPR se denominó **L** (modificada de Horvath y Barrangou, 2010).

Proceso de Inmunidad: en la segunda etapa del mecanismo CRISPR-Cas, se presume que cuando ingresa ADN exógeno a la bacteria, el arreglo CRISPR formado por repetición-espaciador se transcribe a pre-crRNA, que es procesado por proteínas Cas a crRNAs maduros y forma un complejo con otras proteínas Cas. Dicho complejo se dirige hacia el material genético del fago (por apareamiento de bases) y lo degrada (Horvath y Barrangou, 2010).

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. 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).

7.5. Infección abortiva (Abi)

Este mecanismo está caracterizado por un desempeño normal 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 directamente, no se libera la nueva progenie (Rousseau y col., 2012).

Estos sistemas incluyen mecanismos que interfieren en diversas etapas de la multiplicación fágica. Pueden afectar la replicación del genoma fágico, la transcripción, la 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 de defensa está muy difundido en *Lactococcus* y también ha sido reportado en *St. thermophilus* y *Lactobacillus* (Garneau y Moineau, 2011; Quiberoni y col., 2011). 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 superar 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).

8. Mutantes espontáneos fagorresistentes

Desde hace casi 80 años, las infecciones fágicas son reconocidas como un grave problema al cual debe enfrentarse la industria fermentativa de alimentos, debido a que pueden causar la lisis celular del cultivo iniciador, produciendo un retardo o bloqueo en la fermentación. Sin embargo, a pesar de las notables mejoras en cuanto a higiene y sanitización aplicadas en los procesos industriales, así como en la minuciosa selección de cultivos iniciadores, la industria láctea continúa siendo víctima de la actividad depredadora de los fagos que contaminan naturalmente la materia prima y el ambiente de las plantas (Briggiler Marcó y col., 2012; Carminati y col., 2016).

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

Los mutantes espontáneos fagorresistentes pueden obtenerse por la exposición prolongada de una determinada cepa fago-sensible, a uno o más fagos líticos. Como consecuencia de ello, sobrevivirá solamente una pequeña fracción de la población celular bacteriana, que resultará resistente a dichos fagos. En este sentido, numerosas investigaciones han descrito el aislamiento de derivados fagorresistentes a partir de cepas sensibles a fagos de *Lactococcus* (Limsowtin y Terzaghi 1976; Weimer y col., 1993), *St. thermophilus* (Viscardi y col., 2003; Binetti y col., 2007; Horvath y col., 2012), *Lb. helveticus* (Neviani y col., 1992; Carminati y col., 1993; Reinheimer y col., 1993; Quiberoni y col., 1998a) y *Lb. delbrueckii* (Guglielmotti y col., 2006). En general, el mecanismo implicado en la generación de mutantes fagorresistentes 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). Sin embargo, estudios recientes (Barrangou y col., 2007; Deveau y col., 2008; Sorek y col., 2008; Mills y col., 2010) han revelado que los sistemas CRISPR-Cas desempeñan un rol fundamental en la generación natural de derivados fagorresistentes. Actualmente se sabe que estas estructuras CRISPR, presentes en el genoma de numerosas bacterias y en la mayoría de las *Archaea*, otorgan inmunidad heredable

y flexible frente a material genético foráneo, incluidos los fagos, por lo que resultan una herramienta muy ventajosa para el diseño y desarrollo de nuevos cultivos fagorresistentes para la industria láctea fermentativa (Carminati y col., 2016).

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 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. 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 °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. Sin embargo, existen ciertas desventajas, como una elevada tasa de reversión del fenotipo fagorresistencia, resistencia limitada a fagos relacionados, reducción de la velocidad de crecimiento y menor capacidad acidificante y/o proteolítica (Sturino y Klaenhammer, 2004; Moineau y Lévesque, 2005). Además, 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; Moineau y

Lévesque, 2005; Horvath y col., 2012). En este sentido, el grupo DuPont™ (*DuPont Nutrition Biosciences ApS*) fue pionero en la obtención de derivados fagorresistentes en cepas de *St. thermophilus* cuya fagorresistencia es debida a mecanismos CRISPR-Cas (Barrangou y Horvath, 2012), dando origen a numerosas patentes, entre ellas una Patente Europea (Horvath y col., 2012). En la actualidad existen en el mercado cultivos iniciadores para la elaboración de quesos (CHOOZIT™ SWIFT, DuPont™) compuestos de cepas de *St. thermophilus* que, además de poseer buena capacidad acidificante, cuentan con fagorresistencia mejorada. A su vez, la misma compañía ha usado la tecnología CRISPR para optimizar todos sus cultivos de *St. thermophilus* y está desarrollando actualmente un cultivo *starter* para yogur (Carminati y col., 2016).

A circular, grayscale microscopic image showing various biological structures, likely cells or microorganisms. The structures are rendered in shades of gray, with some showing distinct textures and shapes. The word "OBJETIVOS" is overlaid in the center in a bold, black, sans-serif font.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Generar conocimientos científicos sobre la interacción de *Leuconostoc* sp. con fagos específicos aislados de la industria láctea fermentativa.

Objetivos específicos

- ❖ Aislar fagos de *Leuconostoc* mediante un monitoreo en una planta quesera local.
- ❖ Caracterizar morfológica, fenotípica y genéticamente fagos específicos del género.
- ❖ Determinar la difusión de la sensibilidad fágica en cepas comerciales de *Leuconostoc*.
- ❖ Estudiar las particularidades de la interacción entre las cepas sensibles de *Leuconostoc* y sus fagos específicos.

A circular, grayscale microscopic image showing several biological cells. The cells have a textured, fibrous appearance. In the center, a thin, needle-like instrument is positioned, touching one of the cells. The background is filled with other similar cells, some in focus and some blurred.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Leuconostoc* sensibles a fagos utilizadas en este trabajo fueron aisladas de distintos fermentos comerciales usados para la elaboración de quesos azules. Las mismas se identificaron como R707, C19A, C19B, CyC, D4, D4b, D6a, L79-1 (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas y fagos de *Leuconostoc* aislados durante elaboraciones de queso azul y utilizados en este trabajo.

Fago	Cepa indicadora	Origen	Fecha de aislamiento
LDG	R707	Suero de molde	05/2009
CHA	C19A	Suero de molde	05/2009
CHB	C19B	Suero de tina	05/2009
CyC1	CyC	Suero de molde	12/2009
CyC2			
Ln-6	D4	Suero de tina y molde	04/2010
Ln-7	D4b	Suero de tina	05/2010
Ln-8	D6a	Suero de tina	09/2011
Ln-9	L79-1	Suero de molde	02/2012

1.1. Conservación y reactivación de las cepas

Las cepas bacterianas se conservaron por congelamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando caldo MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, Biokar, Beauvais, Francia) suplementado con glicerol (15 % v/v), como crioprotector. Para ello, las cepas fueron desarrolladas previamente durante 16-18 h (*over-night*) en caldo MRS a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, estos cultivos frescos se inocularon al 20 % (v/v) en el medio crioprotector, repartidos en alícuotas de 1 ml en crioviales estériles, y finalmente congelados a -20 y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las cepas conservadas por congelamiento se reactivaron en caldo MRS e incubaron a 30 °C durante 16-18 h. Para su posterior uso en los diferentes ensayos, las cepas reactivadas fueron sucesivamente repicadas en caldo MRS estéril e incubadas en similares condiciones.

1.2. Identificación molecular de las cepas de *Leuconostoc*

Se realizó la amplificación de los genes de la región 16S del ADNr de las cepas de *Leuconostoc* sensibles a fagos utilizadas en esta Tesis, con el objetivo de confirmar la identificación de especie. En primer lugar, se extrajo el ADN total bacteriano utilizando el *kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA* (Sigma). Luego se amplificó la región hipervariable de los genes 16S del ADNr, siguiendo protocolos previamente publicados (Lane, 1991; Zacarías y col., 2011), utilizando los *primers* 27F y 1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', respectivamente). La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl: 5 µl de *buffer* de PCR 10X, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de los *primers*, 2,5 U/100 µl de ADN *Taq* polimerasa (Sigma), 24 µl de agua estéril y 1 µl de ADN total. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 10 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 30 s (desnaturalización), 60 °C durante 30 s (hibridación), y 72 °C durante 45 s (extensión), y una elongación final a 72 °C durante 20 min. Estas reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los productos de amplificación se secuenciaron a través del servicio prestado por Macrogen (Seúl, Corea), y las secuencias obtenidas se compararon con aquellas de las principales especies de BAL, disponibles en bases de datos (BLAST alignment tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.3. Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

El grado de homología o diversidad genética entre las cepas de *Leuconostoc* utilizadas en esta Tesis, se determinó mediante el análisis de los perfiles de RAPD-PCR. Para ello, se aisló el ADN genómico utilizando el *kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA* (Sigma). Para la amplificación por PCR se utilizaron dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) en ensayos independientes. Los *primers* utilizados fueron M13 (Huey y Hall, 1989; Stenlid y col., 1994) y

1254 (Akopyanz y col., 1992), cuyas secuencias son 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' y 5'-CCGCAGCCAA-3', respectivamente. El ensayo de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l, conteniendo 2,5 μ l de *buffer* de PCR 10X, 200 μ M de cada dNTP, 2,5 U/100 μ l de ADN *Taq* polimerasa (Sigma), 3,0 mM de MgCl₂, 2,0 μ M de *primer* M13 ó 0,8 μ M de *primer* 1254, y 1,5 μ l de ADN total bacteriano. Para el *primer* M13, se siguió el protocolo utilizado por Giraffa y col. (2000). La etapa inicial (94 °C, 2 min) fue seguida por 40 ciclos a 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 45 °C durante 20 s (hibridación) y 72 °C durante 2 min (extensión), y una elongación final a 72 °C durante 10 min. Para llevar a cabo la amplificación utilizando el *primer* 1254, se aplicaron cuatro ciclos iniciales a 94 °C durante 5 min, 36 °C durante 5 min y 72 °C durante 5 min, seguidos por 30 ciclos a 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 36 °C durante 1 min (hibridación), 72 °C durante 2 min (extensión), y una elongación final a 72 °C durante 10 min (Giraffa y col., 2000). Luego de la amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (1,5 % m/v) adicionados de GelRed™ (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA). Como marcador de peso molecular de ADN se utilizó 1 kb Plus DNA Ladder (GE Healthcare Life Sciences, Bucks, Reino Unido). Los perfiles de amplificación fueron revelados mediante aplicación de luz UV y fotografiados 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 guardados como archivos TIFF. Luego fueron analizados utilizando el *software* BioNumerics™ (versión 6,0; Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Latem, Bélgica). El cálculo de similitudes de los perfiles de amplificación estuvo basado en el coeficiente r de Pearson, y las cepas fueron agrupadas usando UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) (Vauterin y Vauterin, 1992).

2. Bacteriofagos

Durante el desarrollo de este trabajo, se utilizaron nueve fagos líticos de *Leuconostoc* aislados a partir de elaboraciones de queso azul. Los mismos se identificaron como LDG, CHA, CHB, CyC1, CyC2, Ln-6, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 (Tabla 1).

3. Metodología general empleada para el estudio de fagos de *Leuconostoc*

3.1. Conservación de los fagos

Los fagos se conservaron en heladera (8 °C) como un *stock* filtrado de alto título. También se dispuso de una reserva almacenada a -20 °C y a -80 °C en caldo MRS suplementado con glicerol (15 % v/v), como crioprotector.

3.2. Propagación de los fagos

Los fagos utilizados se propagaron sobre sus correspondientes cepas indicadoras, empleando caldo MRS suplementado con CaCl₂ 10 mM (MRS-Ca) (Neviani y col., 1992). Un cultivo obtenido por incubación durante 16-18 h a 30 °C de la respectiva cepa indicadora se inoculó en caldo MRS-Ca fresco. Luego, se adicionó el fago correspondiente a diferentes dosis infectivas (m.o.i., *multiplicity of infection* = concentración de partículas virales / concentración de células bacterianas), entre 10⁻³ y 1, 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 30 °C por aproximadamente 5 h. La 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 Sartorius, diámetro de poro 0,45 µm), a fin de eliminar los restos celulares. Estas suspensiones fágicas se titularon y luego se almacenaron a 8 °C (*stock* utilizado en todas las experiencias), -20 °C y -80 °C. Para las dos últimas temperaturas, el caldo MRS de las suspensiones fágicas fue adicionado de glicerol (15 % v/v) como crioprotector.

3.3. Titulación de los fagos

La concentración de partículas fágicas (título) de los lisados obtenidos luego de las propagaciones, así como en todas las experiencias donde se cuantificaron los viriones, se determinó por el método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991). De

acuerdo a ésta, en cajas de Petri estériles y divididas en cuartos, se depositaron 2,5 ml de agar MRS adicionado de CaCl_2 10 mM y glicina 100 mM (MRS-Ca-Gli) en cada cuadrante (Lillehaug, 1997). Por otro lado, se prepararon diluciones decimales de las suspensiones fágicas a testear, usando caldo MRS como diluyente. 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. 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 agar MRS-Ca-Gli, correspondiendo a las distintas diluciones efectuadas. Las placas se incubaron en microaerofilia a 30 °C durante 16-18 h. Luego de la incubación se realizó el recuento de las placas de lisis y la determinación del título correspondiente, expresado como unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/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 los bacteriofagos

4.1. Caracterización molecular

Los genomas de los fagos LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 fueron secuenciados y analizados. La caracterización molecular de los fagos Ln-8 y Ln-9 se llevó a cabo en el Département de Biochimie et de Microbiologie, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval (Québec, Canadá) con la colaboración del Dr. Diego Mercanti (INLAIN) y la supervisión del Profesor Sylvain Moineau. Por otro lado, la secuenciación de los fagos LDG, CHA, CHB y Ln-7 se realizó en el Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante (Alicante, España) bajo la supervisión del Profesor Juan Francisco Martínez Mojica.

4.1.1. Extracción del ADN fágico

La extracción de ADN de los fagos Ln-8 y Ln-9 se realizó utilizando el *kit Lambda DNA Maxi* (Qiagen), que se basa en la precipitación de las partículas fágicas con polietilenglicol (PEG) seguida de una cromatografía de intercambio iónico (ver punto **A**).

La extracción de ADN de los fagos LDG, CHA, CHB y Ln-7 se realizó a partir de ADN embebido en bloques de agarosa *low melting* (ver punto **B**, Martínez-García y col., 2014).

(A) Para llevar a cabo la extracción de ADN de los fagos Ln-8 y Ln-9, se inocularon 500 ml de caldo MRS con la cepa indicadora (1 % v/v) incubándose a 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 560 nm ($D.O_{560nm}$) de aproximadamente 0,1. Luego, el cultivo fue adicionado de $CaCl_2$ (10 mM) y de una suspensión fágica para lograr una concentración final de aproximadamente 10^6 UFP/ml. Se incubó (30 °C) hasta observar lisis completa del cultivo. Posteriormente, se centrifugó (10000 *g*, 10 min, 4 °C), se recogió el sobrenadante y se verificó que la concentración fágica fuera de al menos 10^9 UFP/ml. Los sobrenadantes obtenidos de los fagos Ln-8 y Ln-9 fueron adicionados de 800 μ l de *buffer* L1 (NaCl 300 mM; Tris-HCl 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; BSA 0,2 mg/ml; RNAsa A 20 mg/ml; DNAsa I 6 mg/ml) y 5 ml de $MgSO_4$ 1 M, y se incubaron a 37 °C por 30 min. Luego de la incubación se agregaron 100 ml de *buffer* L2 (NaCl 3 M; PEG 6000 30 % m/v) a baja temperatura, manteniendo en hielo durante 60 min. A continuación, se centrifugó (10000 *g*, 10 min, 4 °C) descartándose el sobrenadante. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 9 ml de *buffer* L3 (NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 7,5; EDTA 25 mM), adicionado de 900 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) e incubado a 65 °C por 30 min. Posteriormente, se agregaron 9 ml de *buffer* L4 (4 % SDS m/v), incubando a 70 °C durante 20 min. Luego del tratamiento térmico, se adicionaron 9 ml de *buffer* L5 (3 M acetato de potasio, pH 5,5) se agitó en forma suave y se centrifugó (15000 *g*, 30 min, 4 °C). El sobrenadante se removió rápidamente y se centrifugó nuevamente (15000 *g*, 10 min, 4 °C). Posteriormente se realizó la calibración de la columna Qiagen-tip 500 utilizando 10 ml de *buffer* QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM, pH 7; etanol 0, 15 % v/v; Triton X-100 0,15 % v/v). El sobrenadante obtenido con anterioridad fue incorporado sobre la columna, dejando que fluya por gravedad y quedando el ADN retenido en la resina. Luego, se realizó un lavado utilizando 30 ml de *buffer*

QC (NaCl 1 M; MOPS 50 mM, pH 7; etanol 0, 15 % v/v) y posteriormente el ADN se eluyó de la columna con 15 ml de *buffer* QF (NaCl 1,25 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; etanol 15 % v/v) a baja temperatura, recogiendo el eluato en un tubo limpio. Finalmente el ADN se precipitó con 10 ml de isopropanol y se centrifugó (15000 *g*, 30 min, 4 °C). Se adicionó igual volumen de etanol 70 % v/v, 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.

(B) La extracción de ADN de los fagos LDG, CHA, CHB y Ln-7, se realizó inoculando 50 ml de caldo MRS con la cepa indicadora (1 % v/v) e incubando a 30 °C hasta alcanzar una D.O._{560nm} de aproximadamente 0,1. Luego, el cultivo fue adicionado de CaCl₂ (10 mM) y de una suspensión fágica hasta concentración final aproximada de 10⁶ UFP/ml. Se incubó (30 °C) hasta observar lisis completa del cultivo. Se centrifugó (10000 *g*, 10 min, 4 °C), se recogió el sobrenadante y se verificó que la concentración fágica fuera de al menos 10⁹ UFP/ml.

Posteriormente, los sobrenadantes libres de células de los fagos LDG, CHA, CHB y Ln-7 fueron ultracentrifugados a 288000 *g* durante 5 h a 15 °C (Optima XL Series, Beckman Coulter, rotor SW41TI). Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 1 ml del sobrenadante (Antón y col., 1999). Los fagos concentrados se mezclaron con igual volumen de agarosa *low melting* al 1,6 % m/v (Pronadisa, Laboratorios Conda, S.A., Madrid, España) y se colocaron en moldes con capacidad para 100 µl, dejándolos solidificar a temperatura ambiente, de manera de obtener bloques de agarosa con los fagos embebidos.

Los bloques de agarosa solidificados conteniendo los fagos, se incubaron durante 1 h con 1 ml de *buffer* 1 (20 µl de DNasa Turbo 2 U/µl, 200 µl de *buffer* Turbo 10X y 780 µl de agua bidestilada estéril). A continuación, se adicionaron 3 ml de *buffer* ESP (EDTA 0,5 M, pH 9,0, N-laurylsarcosina 1 %, proteinasa K 1 mg/ml) para romper la cápside viral, y se incubaron durante 16 h a 50 °C. Luego, para inactivar la proteinasa K, se lavaron con 2 ml de *buffer* TE-Pefabloc (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, Pefabloc 3 mM, Roche) a 37 °C durante 4 h. Posteriormente los bloques de agarosa fueron separados y lavados 2 veces durante 180 min con *buffer* TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0).

Para eliminar la agarosa y obtener los ADN virales, los bloques fueron calentados a 70 °C durante 15 min y preenfriados a 42 °C. Luego fueron tratados con β -agarasa 1 U/100 μ l (New England Biolabs) e incubados a 42 °C durante 90 min. A continuación, los ADN se purificaron y concentraron utilizando el microfiltro *Microcon Centrifugal Filter Devices* YM-100 (Millipore). Los ADN purificados se conservaron a -20 °C.

4.1.2. Perfiles de restricción de los fagos

El ADN fágico fue digerido con las enzimas de restricción XhoI, HindIII, EcoRV y ClaI, que 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 % m/v), de acuerdo a lo descrito por Sambrook y Russell (2001). El cálculo de similitudes de los perfiles estuvo basado en el coeficiente r de Pearson y se utilizó el *software* BioNumerics™ (versión 6,0; Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Latem, Bélgica). Se consideraron patrones diferentes cuando el porcentaje de similitud fue inferior al 90 %.

4.1.3. Secuenciación de genomas fágicos

Las bibliotecas de ADN de los 6 fagos secuenciados fueron preparadas con el *kit Nextera XT DNA Sample Prep* (Illumina). Los fagos Ln-8 y Ln-9 fueron secuenciados en el Centre Hospitalier Université Laval (Québec, Canadá). Por otro lado, los fagos LDG, CHA, CHB y Ln-7 se secuenciaron en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO, Valencia, España). Para todas las secuenciaciones se empleó el *Kit MiSeq Reagent V2* en secuenciadores de segunda generación MiSeq de Illumina (Illumina 500 ciclos).

Las secuencias obtenidas se editaron usando el *software* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Los ORFs (Open Reading Frames) se identificaron mediante los programas ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) y GeneMark (http://exon.biology.gatech.edu/genemark_prok_gms_plus.cgi). Un ORF se consideró válido si el mismo codificaba para al menos 25 aminoácidos, era precedido por la secuencia de Shine-Dalgarno 5'-TAGGAGGT-3' y comenzaba con los codones AUG, UUG o GUG.

La función de cada ORF fue asignada usando los programas Blast2go (http://blast2go.bioinfo.cipf.es/start_blast2go) y Blastp (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Estos resultados se reforzaron 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/>). El peso molecular teórico (MM), así como también el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas, se calcularon usando la herramienta *Prot Param* disponible en el sitio web ExPASy (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Por otro lado, y usando el programa Gegenees (versión 2.2.1), se construyó un árbol filogenético a partir de 28 genomas de fagos que infectan BAL. Dicho *software* realiza una comparación '*all against - all comparison*' de los genomas y construye una matriz, la cual es a su vez utilizada por el programa SplitsTree (versión 4.14.4), mediante el método NJ (*Neighbor-joining*), para la construcción del mencionado árbol filogenético. Los elementos individuales de la matriz corresponden a los valores ANI (*Average Nucleotide Identity*).

4.1.4. Purificación del fago Ln-8

La identificación de las proteínas estructurales de los fagos fue precedida por su purificación. Debido al elevado costo de los análisis de identificación de proteínas estructurales, este estudio se realizó solamente para el fago Ln-8. Dicho fago fue purificado por ultracentrifugación mediante dos gradientes consecutivos de CsCl (Guglielmotti y col., 2009), el primero discontinuo y el segundo continuo. Antes de las etapas de ultracentrifugación, se procedió a obtener una solución concentrada de fagos. Con esta finalidad, se inoculó 1 litro de caldo MRS con la cepa sensible (1 % v/v), incubándose a 30 °C hasta alcanzar una D.O._{560nm} de aproximadamente 0,1. Luego se adicionó CaCl₂ (10 mM) y 300 µl del fago Ln-8 (concentración final de 10⁴ - 10⁵ UFP/ml) y se incubó a 30 °C hasta observar lisis del cultivo. El cultivo lisado fue centrifugado (8000 *g*, 15 min a 4 °C). El sobrenadante fue adicionado de NaCl (0,5 M) y polietilenglicol (PEG) 8000 (Laboratoire Mat, Quebec, Canadá) en una concentración final de 10 % (m/v). 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 mediante centrifugación (8000 *g*, 15 min, 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).

La primera etapa de purificación se realizó aplicando un gradiente discontinuo de CsCl. Este se preparó 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 colocados en un tubo de centrífuga (14 x 89 mm). Por encima de esta solución se depositaron, muy cuidadosamente, 2 ml de la solución B y finalmente 1,5 ml de la solución C. La solución conteniendo los fagos fue depositada muy lentamente sobre la superficie del gradiente de CsCl. Posteriormente, los tubos conteniendo el gradiente de CsCl y la suspensión de fagos se centrifugaron utilizando un rotor Beckman (SW41) a 210053 *g* (35000 rpm) durante 3 h a 20 °C. Luego de la centrifugación, se verificó la presencia de una banda azul, y la misma fue extraída usando una jeringa de 10 ml. 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.

La segunda etapa de purificación se llevó a cabo mediante un 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 centrífuga (16 x 67 mm). La suspensión de fagos obtenida 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 h a 20 °C. Tal como se describió anteriormente, fue verificada la presencia de una banda azul, y la misma fue extraída usando una jeringa de 10 ml. 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.

Luego de ambas etapas de purificación (discontinua y 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

La identificación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS), en el Centre Protéomique de l'Est du Québec (Québec, Canadá). Para la identificación por SDS-PAGE, una alícuota del fago purificado y concentrado (10^{11} UFP/ml) se mezcló 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), sometido a un tratamiento térmico (95 °C durante 5 min) y a 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 % m/v y 12 % m/v 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.

4.2. Microscopía electrónica

Las micrografías de los fagos fueron obtenidas en la Unidad de Microscopía del Département de Biologie Medicale, Faculté de Médecine, Université Laval (Québec, Canadá).

Para realizar las observaciones microscópicas, 10 μ l de la solución de tinción (2 % ácido fosfotúngstico, pH 7,0) se colocaron 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 μ l de la suspensión de fagos (10^9 UFP/ml) se mezclaron durante 90 s con la solución de tinción contenida en la grilla. Posteriormente, las grillas se depositaron sobre un papel secante durante 5 min. Las observaciones se realizaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 (Philips, Eindhoven, Países Bajos) operado a 60 kV.

4.3. Viabilidad fágica durante la conservación

Se realizó un seguimiento de la viabilidad de las suspensiones fágicas a lo largo de su conservación a 25 °C, 8 °C, -20 °C y -80 °C durante 10 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 fágica 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 ajustados a los distintos valores de pH (concentración final aproximada de 10^6 UFP/ml) y se dejaron en contacto por 30 min a 30 °C. En paralelo, se incubó un control donde el pH original del caldo no fue modificado (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. Cinéticas de inactivación térmica

Se llevaron a cabo estudios de inactivación térmica de los fagos, en tres medios de suspensión diferentes: caldo MRS, LDR (leche descremada reconstituida estéril, 10 % m/v) y *buffer* TMG (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, MgSO₄ 10 mM y gelatina 0,1% m/v). Las temperaturas elegidas para los ensayos correspondieron a las utilizadas normalmente en la industria para el tratamiento de la leche cruda en distintos procesos (63 °C, 72 °C y 90 °C). A los fagos que resistieron el tratamiento a 72 °C, se les realizó un ensayo adicional a 80 °C en LDR. Los controles fueron incubados a 30 °C.

Las suspensiones fágicas en estudio se inocularon en cada uno de los medios seleccionados (caldo MRS, *buffer* TMG, LDR), de tal manera de obtener una concentración inicial de aproximadamente 10^6 UFP/ml, distribuyéndose luego en tubos Eppendorf (alícuotas

de 1 ml), los cuales fueron mantenidos a las temperaturas preestablecidas en baños de agua termostatzados. 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 tres medios de suspensión. A partir de dichas curvas de supervivencia se determinó, para cada condición, el tiempo necesario para inactivar el 99 % de las partículas fágicas iniciales (T_{99}).

4.6. Cinéticas de inactivación química

Los biocidas fueron elegidos entre aquellos utilizados frecuentemente para desinfección del material de laboratorio y/o equipamiento industrial: alcohol etílico al 50, 75 y 100 % v/v (Cicarelli, Buenos Aires, Argentina), hipoclorito de sodio desde 200 hasta 1600 ppm de cloro activo (Clorox Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina), ácido peracético 0,15 % v/v (Proxitane 1512, Química General, Santa Fe, Argentina), cloruro de amonio cuaternario al 0,25 y 0,50 % v/v (biocida A), espuma clorada alcalina al 2,5 % v/v (biocida C), nonil fenol etoxilado y ácido fosfórico al 0,8 % v/v (biocida E), N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropano-1,3-diamina al 2 % v/v (biocida F). Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (25 °C). Los sanitizantes fueron diluidos en agua destilada estéril hasta la concentración deseada, con la excepción del hipoclorito de sodio que fue diluido en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7 (Quiberoni y col., 2003).

Las partículas fágicas, ensayadas a una concentración inicial de 10^6 UFP/ml aproximadamente, fueron incubadas en cada uno de los biocidas a 25 °C. 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.

Para evaluar el efecto del pH de cada biocida sobre la viabilidad de los fagos, las partículas virales se resuspendieron en agua destilada estéril ajustando a los valores de pH de cada biocida ensayado.

5. Interacción de *Leuconostoc* con sus fagos específicos

5.1. Influencia del catión Ca^{2+} en el ciclo lítico de los fagos

Para estudiar la influencia del Ca^{2+} sobre la lisis celular, se inocularon 200 μl de un cultivo de 16-18 h (30 °C) de las cepas indicadoras en 5 ml de caldo MRS con y sin CaCl_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 30 °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 permitiera un buen crecimiento de la cepa en el tubo control, detectando la ocurrencia o no de lisis del cultivo, en presencia o ausencia del catión ensayado. Los cultivos en los que no se observó lisis, se repicaron por tres días sucesivos, partiendo de los tubos correspondientes del día anterior y continuando con el monitoreo visual.

5.2. Determinación del espectro de hospedadores y eficiencia de plaqueo

El espectro de cepas hospedadoras se determinó enfrentando los fagos LDG, CHA, CHB, CyC1, CyC2, Ln-6, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 con todas las cepas detalladas en la Tabla 1. Con esta finalidad, se aplicaron tres metodologías: test de turbidez (medio líquido), *Spot test* (medio agarizado) (Svensson y Christiansson, 1991) y eficiencia de plaqueo (EOP - *Efficiency of plaquing*).

Para llevar a cabo el test de turbidez, tubos conteniendo 5 ml de caldo MRS-Ca y 50 μl de cultivo de la cepa a ensayar fueron adicionados de alícuotas de 200 μl de cada filtrado fágico (m.o.i. = 0,25) e incubados a 30 °C. Aquellos tubos que no presentaron lisis, es decir, cuya turbidez no disminuyó, luego de la incubación, fueron repicados nuevamente en tubos conteniendo 5 ml de caldo MRS-Ca. En total, se realizaron cinco repiques sucesivos en caldo

MRS-Ca. Una cepa se consideró sensible si el cultivo presentó lisis como máximo en el quinto repique de sensibilidad; de lo contrario se la consideró resistente al fago en cuestión.

Para los ensayos en medio agarizado (*Spot test*), en una caja de Petri estéril conteniendo una base de agar MRS-Ca-Gli se agregó una mezcla de 0,3 ml de un cultivo desarrollado por 16-18 h (30 °C), CaCl₂ 50 mM y 3 ml de MRS *soft*-agar. Luego, las placas se dejaron secar durante 30 min (en gabinete de flujo laminar horizontal CASIBA) y se agregó una gota (10 µl) de la suspensión fágica en estudio. Una vez que las gotas fueron absorbidas, las placas se incubaron en microaerofilia a 30 °C durante 16-18 h. Una cepa se consideró sensible al fago ensayado si, en el sitio donde se había depositado la gota, aparecía una zona de inhibición del desarrollo bacteriano (zona de lisis).

Por otro lado, para analizar la eficiencia de plaqueo de los fagos LDG, CHA, CHB, CyC, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 sobre todas las cepas detalladas en la Tabla 1, se realizaron recuentos de partículas fágicas en agar MRS-Ca-Gli. La eficiencia de plaqueo se definió como la relación entre el título obtenido con la cepa en estudio y el logrado con la cepa indicadora, calculándose de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{EOP} = \frac{\text{Título fágico con la cepa en estudio [UFP/ml]}}{\text{Título fágico con la cepa indicadora [UFP/ml]}}$$

5.3. Ciclos de multiplicación fágica (*Burst size*)

Las cepas de *Leuconostoc* (Tabla 1) fueron desarrolladas en caldo MRS incubando a 30 °C, hasta alcanzar una D.O._{560nm} aproximada de 0,5. Las células fueron cosechadas por centrifugación (5 min, 5000 *g*, 4 °C) y los *pellets* se resuspendieron en caldo MRS-Ca (1/5 del volumen inicial). Luego, 1 ml de cada una de las suspensiones bacterianas adicionadas de CaCl₂ (10 mM) se infectó con su respectivo fago (m.o.i. = 0,1) y se incubó por 20 min a 30 °C en baño termostático. Estas condiciones permitieron una adsorción superior al 99 % de las partículas fágicas sobre los receptores bacterianos. A continuación, las mezclas fueron centrifugadas (5 min, 10000 *g*, 4 °C) y los *pellets* se resuspendieron muy cuidadosamente en 1 ml de caldo MRS-

Ca. Posteriormente, los *pellets* resuspendidos fueron transferidos a tubos conteniendo 9 ml de caldo MRS-Ca. A partir de esta suspensión se efectuaron diluciones decimales en caldo MRS-Ca. Estas diluciones se realizan 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 30 °C en baño de agua termostatzado, y a intervalos regulares de tiempo, se extrajeron alícuotas (100 µl) que fueron inmediatamente tituladas sobre la cepa indicadora correspondiente, para conocer el número de partículas fágicas libres (Chow y col., 1988).

Los resultados se expresaron como partículas fágicas liberadas por centro de infección. El número de centros infectivos está dado por el número de placas de lisis formadas durante los primeros minutos de la infección. Durante este período, llamado fase de latencia, el número de UFP/ml se mantiene relativamente constante y corresponde al número de infecciones productivas obtenidas después de la adsorción (Birge, 1994). Los parámetros denominados períodos de latencia, *burst time* y *burst size*, fueron calculados a partir de las curvas de crecimiento obtenidas.

5.4. Caracterización de la adsorción

Las cepas bacterianas fueron desarrolladas en caldo MRS a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial temprana ($D.O_{560nm} = 0,5$), cosechándose luego las células por centrifugación (5000 *g*, 5 min, 4 °C). Luego de descartar los sobrenadantes, los *pellets* se resuspendieron en caldo MRS fresco, en la mitad del volumen original. Cada cultivo se infectó con el fago correspondiente (m.o.i. = 0,02) en tubos Eppendorf y se incubaron a 30 °C en baño de agua termostatzado. A tiempos predeterminados se retiraron los tubos y se centrifugaron (10000 *g*, 5 min, 4 °C) con el objeto de separar los fagos libres. Inmediatamente, se extrajeron alícuotas de los sobrenadantes y se titularon sobre su correspondiente cepa indicadora (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:

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

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

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

5.4.1. Influencia del calcio

Se procedió como en un ensayo de adsorción típico, pero en este caso se utilizaron dos alícuotas de las células en suspensión, la primera adicionada de CaCl₂ (10 mM) y la segunda sin la adición de este catión. Se realizaron recuentos de partículas fágicas a 0, 2, 10 y 20 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⁺).

5.4.2. Influencia de la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura de incubación sobre la adsorción fágica. Con este objetivo, se aplicaron las metodologías de adsorción ya descritas (Sección 5.4), agregando CaCl₂ (10 mM) al medio, y respetando las demás condiciones de infección (Quiberoni, 1997). Se estableció un tiempo de adsorción de 20 min, incubando a 0 °C, 10 °C, 20 °C, 32 °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 indicó antes. Los resultados fueron expresados como porcentaje de partículas fágicas adsorbidas en 20 min, para las distintas temperaturas ensayadas.

Con el objetivo de conocer el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las cepas, alícuotas (1 ml) de las suspensiones celulares en caldo MRS (10⁹ UFC/ml) fueron incubadas a todas las temperaturas testeadas durante 20 min. Luego del ensayo, se realizaron recuentos celulares (en MRS agarizado) y se compararon con los valores obtenidos inicialmente.

5.4.3. Influencia del pH

El efecto de este parámetro sobre la adsorción se estudió empleando caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH, con soluciones concentradas de NaOH o HCl. Se utilizó la técnica de adsorción ya descrita, agregando CaCl₂ (10 mM) al medio de suspensión y respetando las demás condiciones de infección. 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 valores de pH (a 30 °C) (Sección 4.4). Las suspensiones celulares infectadas se incubaron 20 min a 30 °C y luego se procedió a centrifugar los tubos Eppendorf, operándose como se indicó en la Sección 5.4. Los resultados fueron expresados como porcentaje de adsorción a 20 min, para los distintos valores de pH ensayados.

Se monitoreó la viabilidad de las cepas en caldo MRS ajustado a distintos valores de pH. Para ello, se preparó la suspensión celular tal como se indicó previamente para los ensayos de adsorción, pero la resuspensión se realizó en caldo MRS-Ca ajustando a los distintos valores de pH (entre 4 y 9), así como también en caldo MRS sin ajuste de pH (pH 6,5 ± 0,2), a modo de control. Las suspensiones se incubaron a 30 °C en baño termostatzado durante 20 min. Cumplido ese tiempo, se realizaron inmediatamente recuentos celulares en agar MRS, que fueron incubados a 30 °C por 48 h.

5.4.4. Influencia del estado fisiológico celular

Se analizó la influencia del estado fisiológico de las células bacterianas de *Leuconostoc* sobre la adsorción fágica. Con este objetivo, se realizó el ensayo de adsorción sobre células viables (metabólicamente activas) y no viables (inactivas metabólicamente). Las células no viables se obtuvieron aplicando dos métodos diferentes: tratamiento térmico y con un inhibidor de la síntesis de proteínas.

a) Tratamiento térmico de las células bacterianas sensibles a fagos

Se analizó el efecto de un tratamiento térmico aplicado a las células bacterianas sensibles, sobre la adsorción de los fagos a la superficie celular. Para ello se utilizó un cultivo

(obtenido como se explicó en el punto 5.4), que 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 % v/v) la suspensión celular tratada en caldo MRS, incubando por 48 - 72 h a 30 °C y monitoreando la presencia o no de turbidez debida al desarrollo de las células bacterianas. La pérdida de viabilidad también se evaluó por estriado del cultivo tratado térmicamente en placas de agar MRS, que se incubaron 30 °C por 48 - 72 h y finalmente se observaron para detectar eventuales colonias desarrolladas.

La suspensión de células tratadas térmicamente fue adicionada de CaCl₂ (10 mM) y utilizada para realizar el ensayo de adsorción. Como control, se realizó la adsorción utilizando células viables (sin tratamiento térmico) adicionadas de CaCl₂ (10 mM). Se realizó la titulación de las partículas fágicas a los 5, 10 y 20 min de incubación.

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

b) Tratamiento de las células bacterianas con un inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol)

En una primera etapa, fue determinada la mínima concentración de cloranfenicol (Elea, Buenos Aires, Argentina) necesaria para inhibir la síntesis de proteínas en las cepas de *Leuconostoc* en estudio (Tabla 1). Para ello, los cultivos en fase exponencial de crecimiento ($D.O_{.560nm} = 0,5$) fueron centrifugados y resuspendidos (10^8 UFC/ml) en caldo MRS con 100 µg/ml o 250 µg/ml de cloranfenicol (diluidos en agua destilada estéril), distribuidos en tubos Eppendorf (1 ml) e incubados a 30 °C durante 120 min. Un cultivo con el mismo tratamiento, pero sin el agregado del antibiótico fue usado como control. A intervalos de tiempo regulares, se realizaron recuentos celulares (agar MRS, 30 °C, 48 h) y se midió la $D.O_{.560nm}$.

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 30 °C hasta lograr la inhibición de la síntesis de proteínas. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en caldo MRS-Ca y finalmente incubadas a 30 °C. A determinados intervalos de tiempo, se midió la densidad óptica ($D.O_{.560nm}$).

Sobre la base de los resultados obtenidos en los ensayos previos, el experimento de adsorción se llevó a cabo sobre las cepas indicadoras previamente tratadas con cloranfenicol (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 75 min), sin remover el antibiótico durante el ensayo de adsorción. Las células tratadas con el antibiótico fueron infectadas con el fago correspondiente ($m.o.i = 0,05$) e incubadas a 30 °C durante 20 min. La concentración de partículas fágicas fue determinada como se indicó en la Sección 5.4. Un cultivo celular con similar tratamiento pero sin el agregado del antibiótico fue utilizado como control.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de adsorción a los 20 min y comparados con los valores obtenidos para el cultivo control.

5.4.5. Influencia de la multiplicidad de infección (m.o.i.)

Se analizó el efecto de la m.o.i. (concentración de partículas virales / concentración de células bacterianas) sobre la adsorción de los fagos a los receptores de la superficie celular. En esta experiencia se definió, además, la m.o.i.c. como la relación entre la m.o.i. y el número medio de células por cadena. El número de células por cadena fue determinado contando el número de cocos en, al menos, 50 cadenas para cada cepa de *Leuconostoc* en estudio (1000x, microscopio óptico JENAMED 2 Carl Zeiss, Jena, Alemania). Para todas las cepas de *Leuconostoc* investigadas, el número medio de células/cadena fue de 2,5; por lo que la m.o.i.c. se calculó como $m.o.i / 2,5$.

5.5. Caracterización preliminar de receptores fágicos

El estudio preliminar de los receptores fágicos presentes en cada una de las cepas indicadoras, se realizó sobre paredes celulares o sobre células enteras, dependiendo de la cepa.

5.5.1. Caracterización de receptores sobre paredes celulares

a) Obtención de 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 h (30 °C) de las cepas de *Leuconostoc* en estudio, se inocularon (2 %) 500 ml de caldo MRS e incubaron a 30 °C hasta alcanzar una D.O._{560nm} = 0,5 - 0,8. Las células fueron recolectadas por centrifugación (5000 g, 10 min, 4 °C). Luego de separar el sobrenadante, se realizaron dos lavados del *pellet* en 1/10 del volumen inicial con *buffer* fosfato (10 mM, pH 6,8), centrifugando luego de cada lavado (5000 g, 15 min, 4 °C). Se resuspendieron las células en *buffer* fosfato (1/10 del volumen inicial) y 25 ml de la suspensión celular se colocaron en tubos FALCON (de 50 ml de capacidad), agregando 10 g de perlas de vidrio estériles (Sigma - 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. 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 mediante 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 h, enfriando alternadamente en baño de hielo cada 30 s. La efectividad de la rotura de las células bacterianas fue seguida por microscopía óptica y confirmada por recuento en microplaca (recuento final).

Las perlas de vidrio fueron separadas del sobrenadante por sedimentación (reposo durante 2 h a 0 - 4 °C). Luego de este tiempo, se recuperó el sobrenadante y las perlas fueron lavadas 4 veces con *buffer* fosfato (10 mM, pH 6,8), dejando sedimentar 2 h 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 (3500 g, 15 min, 4 °C) y la efectividad de la centrifugación en la separación de células enteras y detritus de las paredes fue confirmada mediante un recuento celular del

sobrenadante. El *pellet* obtenido fue descartado y el sobrenadante, conteniendo las paredes celulares, fue centrifugado (12000 *g*, 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 celulares 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), centrifugando (12000 *g*, 2 min, 4 °C) y descartando el sobrenadante luego de cada lavado para 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 (12000 *g*, 15 min, 4 °C), se almacenaron a -20 °C (Quiberoni y col., 2000).

b) Microtécnica de recuento bacteriano en placa

Una de las formas de evaluar la eficiencia en la ruptura de células bacterianas, fue mediante recuento bacteriano en microplaca. Para ello, se realizaron diluciones decimales de la muestra en agua de peptona (0,1 % m/v). En cajas de Petri estériles, divididas en cuartos, se dispuso una base de agar MRS y 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 30 °C por 48 h y se realizaron los recuentos de las UFC/ml considerando para el cálculo, el factor de dilución correspondiente.

c) Calibración de las paredes celulares

Se realizó para conocer la cantidad de paredes celulares a utilizar en los ensayos posteriores, 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; Quiberoni y col., 2000).

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 10^6 UFP/ml, y se incubaron en baño termostático a 30 °C por 20 min, junto con un control de fagos sin paredes en Tris-HCl-Ca. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugó (12000 g, 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).

d) Tratamientos selectivos sobre paredes celulares

Conocida la dilución de trabajo, adoptada en función de la calibración realizada, se resuspendió el *stock* de paredes celulares, 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 % m/v): 30 min a 37 °C, sumergiendo luego en baño de hielo para detener la reacción.

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

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

Luego de completarse los tratamientos individuales, las paredes tratadas y las paredes control fueron lavadas 5 veces con *buffer* fosfato (10 mM, pH 6,8), centrifugando (12000 g, 10 min, 4 °C) 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.

5.5.2. Caracterización de receptores sobre células enteras

Un cultivo bacteriano desarrollado en caldo MRS a 30 °C hasta $D.O_{560nm} = 0,5$, se centrifugó (5000 *g*, 10 min, 4 °C) y el *pellet* se lavó dos veces con *buffer* fosfato (10 mM, pH 6,8). Luego se resuspendió el *pellet* en *buffer* Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), y se alicuotó en cinco tubos Eppendorf, para realizar los tratamientos de acuerdo a lo descrito en el punto **d**) de la Sección 5.5.1.

Luego de completar los tratamientos individuales, las células se lavaron 5 veces con *buffer* fosfato (10 mM, pH 6,8), se centrifugaron (5000 *g*, 10 min, 4 °C) descartando el sobrenadante luego de cada lavado. Finalmente, los *pellets* conteniendo las células se resuspendieron en Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), en el mismo volumen inicial.

Antes de realizar los ensayos de adsorción propiamente dichos, se efectuaron 3 controles de adsorción, el primero sobre las células enteras y viables resuspendidas en *buffer* Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), el segundo con células tratadas durante 15 min a 90 °C y el tercero con células tratadas a 100 °C durante 3 min. Estos controles se hicieron con el objetivo de asegurar de que no se produjera la pérdida de material durante los lavados y que las temperaturas utilizadas durante los tratamientos enzimáticos no afectaran la adsorción. Para poder realizar los ensayos, las tasas de adsorción deben ser iguales o mayores al 90 %.

5.5.3. Ensayos de adsorción

Las paredes celulares y las células enteras tratadas, así como los controles correspondientes, se utilizaron sin ser diluidos ya que sólo en esta condición se obtuvo una adsorción mayor al 90 %. Alícuotas de 0,9 ml de paredes celulares o de células enteras fueron adicionadas de CaCl₂ (10 mM) y de 0,1 ml de una dilución del fago (10⁶ UFP/ml). Se incubó 20 min a 30 °C en baño de agua, y luego de este tiempo se centrifugó (12000 *g*, 5 min). 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 o células enteras

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

6. Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas de *Leuconostoc*

El aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas sensibles a fagos de *Leuconostoc* se llevó a cabo utilizando la metodología de Cultivos Secundarios (Briggiler Marcó y col., 2011). Por un lado, el aislamiento de los mutantes fagorresistentes se realizó utilizando cada fago con su correspondiente cepa indicadora. A partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1, también se aislaron mutantes fagorresistentes usando una combinación de todos los fagos de *Leuconostoc* en estudio (cóctel de fagos) (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas, fagos y cóctel de fagos de *Leuconostoc* utilizados para la obtención de mutantes espontáneos fagorresistentes.

Especie	Cepa	Fago
<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	R707	LDG
	C19A	CHA
	C19B	CHB
<i>Leuc. mesenteroides</i>	D4b	Ln-7
	D6a	Ln-8
	L79-1	Ln-9
		cóctel de fagos ^a

^a cóctel de fagos constituido por: LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9.

Para realizar el aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de las cepas de *Leuconostoc* sensibles a fagos, un cultivo fresco de la cepa sensible (16-18 h, 30 °C), fue inoculado al 1 % (v/v) en caldo MRS-Ca e infectado con una suspensión fágica de alto título a diversas dosis infectivas (m.o.i. entre 0,02 y 2). Los fagos que formaron parte del cóctel fueron agregados en volúmenes tal que la m.o.i. estuviera comprendido entre los valores de m.o.i. anteriormente descritos. Durante la incubación a 30 °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), en el transcurso de 24 - 72 h posteriores de incubación a 30 °C. En el caso de no observarse desarrollo luego de 72 h, la incubación se prolongó hasta un máximo de 10 días. Seguidamente, esos cultivos se estriaron en placas de agar MRS, se incubaron (48 h, 30 °C) y se aislaron clones a partir de las colonias obtenidas (Callegari, 1992; Carminati y col., 1993; Briggiler Marcó y col., 2011). Los derivados presuntivamente fagorresistentes aislados fueron purificados y separados de las partículas fágicas mediante tres estriados sucesivos en agar MRS.

6.1. Caracterización del fenotipo fagorresistencia

6.1.1. Confirmación de la fagorresistencia

Con el objetivo de confirmar el fenotipo fagorresistencia de los derivados aislados, se aplicó el test de turbidez (Svensson y Christiansson, 1991). 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 fue aquel utilizado durante el proceso de obtención de mutantes fagorresistentes. Los mutantes inoculados en caldo MRS-Ca fueron incubados a 30 °C, controlando el aumento de la turbidez (por desarrollo del cultivo). Estos cultivos fueron comparados con tubos control inoculados solamente 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 mutantes resistentes a fagos, confirmados (Briggiler Marcó y col., 2011). Los mutantes fagorresistentes confirmados fueron congelados en caldo MRS adicionado de glicerol (15 %, v/v) a -20 °C y a -80 °C.

Por otro lado, con el objetivo de comparar la resistencia fágica entre las variantes fagorresistentes obtenidas bajo presión de un fago y las variantes fagorresistentes obtenidas bajo presión del cóctel de fagos, se estudió el espectro de fagorresistencia para los mutantes espontáneos de *Leuc. mesenteroides* L79-1 (Tabla 2). Con esa finalidad, cultivos en caldo MRS-Ca de los mutantes se pusieron en contacto con dosis adecuadas de los fagos, usando como control tubos conteniendo cultivos de los mutantes sin agregado de fago. Se incubaron a 30 °C hasta desarrollo adecuado del tubo control. Se realizaron tres repiques sucesivos (en caldo MRS-Ca) de cada mutante fagorresistente con los fagos testeados.

6.1.2. Eficiencia en la recuperación de mutantes fagorresistentes

La eficiencia en la recuperación de mutantes fagorresistentes fue calculada de la siguiente manera:

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

6.1.3. 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 30 °C, registrándose el número del repique en el cual el mutante resultó lisado por el fago (Carminati y col., 1993; Briggiler Marcó y col., 2011).

6.1.4. Nivel de fagoresistencia (EOP, *Efficiency of Plaquing*)

Una suspensión del fago (10^9 UFP/ml, aproximadamente) en caldo MRS, fue titulada (técnica de la doble capa agarizada, Sección 3.3) en paralelo sobre un cultivo de la cepa indicadora respectiva y sobre un cultivo del mutante fagoresistente 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; Briggiler Marcó y col., 2011).

6.1.5. Tasas de adsorción fágica

Se determinó el nivel de adsorción de los respectivos fagos sobre cada mutante espontáneo fagoresistente y sobre la cepa indicadora (control). Los ensayos de adsorción fueron llevados a cabo de acuerdo a lo descrito en la Sección 5.4.

Los resultados se expresaron como porcentaje de adsorción y fueron comparados con aquellos obtenidos utilizando la cepa indicadora (control).

6.2. Caracterización molecular de los mutantes espontáneos fagoresistentes

El grado de similitud (homología genética) entre la cepa indicadora sensible a fagos, y los derivados fagoresistentes correspondientes, se determinó mediante el análisis de sus perfiles RAPD-PCR. Para ello, se aisló el ADN genómico utilizando el *kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA* (Sigma) y se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) M13 5'-GAGGGTGGCGTTCT-3' (Huey y Hall, 1989; Stenlid y col., 1994) y 1254 5'-CCGCAGCCAA-3' (Akopyanz y col., 1992). El ensayo de PCR se realizó en un volumen total de 50 μ l, conteniendo 5 μ l de *buffer* de PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen, Brasil), 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen, Brasil), 200 μ M de cada dNTP, 2,5 U de DNA *Taq* polimerasa (Invitrogen, Brasil), el correspondiente *primer*, ya sea M13 (2,0 μ M) o 1254 (0,8 μ M) y 1,0 μ l 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 s (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).

Los programas finalizaron con un ciclo a 72 °C durante 7 min. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (1,8 % m/v) en presencia del colorante GelRed™ (Biotium). Como marcador de peso molecular de ADN se utilizó 1 kb Plus DNA Ladder (GE Healthcare Life Sciences, Bucks, Reino Unido). 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 guardados como archivos TIFF. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas utilizando el *software* para análisis de perfiles de BioNumerics™ (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, en tanto que las cepas y las variantes fueron agrupadas usando el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) (Vauterin y Vauterin, 1992).

6.3. Desarrollo de los mutantes fagorresistentes en leche

A partir de un cultivo en caldo MRS incubado a 30 °C durante 16-18 h de cada uno de los mutantes y de la cepa indicadora fago-sensible, se inocularon (2 %, v/v) 100 ml de leche descremada estéril (LDR), repartiendo alícuotas de 10 ml en tubos de ensayo. Los tubos así repartidos fueron incubados a 30 °C en baño termostático. A intervalos de tiempo preestablecidos (entre 0 y 24 h), se retiraron los tubos y se determinaron los valores de pH, graficando su evolución en función del tiempo.

A las 24 h 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).

7. Estudio preliminar de sistemas CRISPR-Cas en BAL

7.1. Relevamiento de secuencias CRISPR en cepas de *Leuconostoc* y *Lactobacillus* del grupo *casei*

Las experiencias detalladas a continuación se realizaron en el Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante (Alicante, España) bajo la supervisión del Profesor Juan Francisco Martínez Mojica, en el marco de una estadía doctoral.

La búsqueda de secuencias CRISPR en cepas de *Leuconostoc*, se realizó utilizando bases de datos *online*, como CRISPRdb (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/crispr/>) e IMG (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>).

El escaso número de secuencias CRISPR reportadas al presente en cepas de *Leuconostoc*, no permitió el alineamiento y posterior diseño de *primers* para cepas de este género. Por otro lado, debido a la elevada disponibilidad de secuencias CRISPR en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* en bases de datos *online* y la relevancia del tema, se decidió iniciar el estudio de los sistemas CRISPR en este grupo bacteriano. El mismo tuvo como objetivo principal conocer nuevos sistemas CRISPR en BAL y adquirir conocimientos, tanto en herramientas informáticas como en técnicas de biología molecular, para luego estudiar dichos sistemas en cepas de *Leuconostoc*.

En primer lugar, se realizó la búsqueda de secuencias CRISPR reportadas en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus*) que estuvieran disponibles en las bases de datos CRISPRdb e IMG. A continuación, se alinearon las secuencias utilizando *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El alineamiento de las

secuencias tuvo como finalidad: I) encontrar secuencias CRISPR en *Lactobacillus* del grupo *casei*, II) identificar las secuencias líder y PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), III) agrupar, en *clusters*, las cepas que presenten secuencias CRISPR, de acuerdo al tipo de estructuras presentes, y IV) alinear las secuencias agrupadas con el fin de diseñar *primers* para la amplificación de sistemas CRISPR-Cas en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* de la colección del INLAIN.

7.2. Determinación de las secuencias líder y PAM

Adyacente a cada agrupación de repeticiones-espaciadores, existe una secuencia líder, rica en AT, donde se localiza el promotor responsable de la transcripción de esta región. En este estudio, la secuencia líder de las cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* que poseen agrupaciones CRISPR-Cas en su cromosoma se determinó de la siguiente manera: en primer lugar se alinearon las secuencias que flanquean la agrupación de repeticiones-espaciadores (300 pb) de cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* disponibles en las bases de datos CRISPRdb e IMG con el programa Geneious 9.0.2. y luego se identificó la secuencia consenso rica en AT, que fue considerada como la secuencia líder.

Por otro lado, y como se explicara en la introducción, en el genoma fágico existe una secuencia nucleotídica corta, conservada, denominada motivo adyacente al protoespaciador (PAM - *Protospacer Adjacent Motif*), cercana a la secuencia nucleotídica que incorporará la bacteria. El protoespaciador es la secuencia idéntica al espaciador, pero que se encuentra en el genoma fágico. A partir de la base de datos *online* CRISPRdb, se seleccionaron los espaciadores de cepas de *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* que poseían el sistema CRISPR-Cas y cuyas repeticiones eran: 5'-GCTCTTGAAGTATTGATCTGACATCTACCTGAGAC-3' o 5'-GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC-3'. Todos los espaciadores que presentaron una secuencia con una identidad >90 % a regiones de genomas fágicos, fueron utilizados para la determinación de la secuencia PAM, empleando el programa *weblogo* (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

7.3. Identificación de cepas que contienen el sistema CRISPR-Cas en su ADN cromosómico

Para realizar este estudio, se utilizaron 37 cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* almacenadas en la colección del INLAIN, incluyendo cepas de colecciones internacionales, cepas comerciales y cepas salvajes (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* utilizadas en este trabajo.

Especie	Cepa	Origen
<i>Lactobacillus paracasei</i>	A	Comerciales
	A13	
	A14	
	Bio	
	Dn	
	Jp-1	
	L26	
	SA	
	Hn	
	Yk	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	INL1	
	PR	
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393	Colecciones internacionales
	CNRZ 1874	
	ATCC 25302	
	ATCC 27092	
	ATCC 27139	
	BL23	
	CNRZ 1308	
	CNRZ 1976	
	CNRZ 318	
	092ch1 ^a	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	092ch3 ^a	
	092g3 ^a	
	139ch2 ^b	
	139g1 ^b	
	139g2 ^b	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	
	CNRZ 1224	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	72	Salvajes
	81	
	84	
	85	
	86	
	88	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	90	
	INL2	

^a, ^b: Mutantes resistentes al fago MLC-A, obtenidos a partir de las cepas *Lactobacillus paracasei* ATCC 27092 (^a) y *Lactobacillus paracasei* ATCC 27139 (^b) (Capra y col., 2011).

7.3.1. Diseño de *primers* específicos

El diseño de *primers* se realizó a partir del alineamiento de los genomas de *Lactobacillus* del grupo *casei* que presentaron estructuras CRISPR-Cas y que se encuentran en las bases de datos *online*. En dicho alineamiento se incluyeron cepas almacenadas en el cepario del INLAIN, cuyos genomas se encuentran también secuenciados, como *Lb. paracasei* Yk, *Lb. paracasei* A y *Lb. paracasei* BL23 (Genbank accession CM001848.2, CM001861.1 y FM177140, respectivamente). Con este objetivo, se usó el *software* IMG (<https://img.jgi.doe.gov>), que permitió alinear los genomas de varias cepas del grupo *casei*, mientras que la herramienta de diseño de *primers* de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), permitió contar con oligonucleótidos que amplifiquen: I) el arreglo CRISPR, formado por la secuencia líder, repeticiones y espaciadores (csnF: 5'-TTGACGAGGACTTCGTTGAC-3' y crispR: 5'-TGCAATCGGTGAAAGTATCGC-3'), II) el arreglo CRISPR y genes *cas1* y *cas2* (hipoF: 5'-TGGTGACGCTGAGTGCATTT -3' y cobalR: 5'-TTTCAACCAGCGCACTCGAA-3') y III) el gen *cas1* (casF: 5'-GGCCAAGGTGAGCAATCAAG -3' y casR: 5'-ACGTCTGAATAAGCGCCTCA -3').

7.3.2. Extracción de ADN bacteriano

Las cepas mencionadas anteriormente (Tabla 3), fueron desarrolladas durante 16-18 h en 5 ml de caldo MRS, centrifugando luego a 6000 *g* durante 15 min (4 °C). 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 pudieran inhibir la lisozima. 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 utilizó el *kit GenEluteTM Bacterial Genomic DNA* (Sigma Aldrich) para la extracción del ADN. 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.

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 bromuro de etidio y posterior visualización en transiluminador (UV).

7.3.3. Secuenciación y amplificación de la región CRISPR y genes asociados

Se partió del ADN total bacteriano extraído previamente y se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) descritos en la Sección 7.3.1.

El ensayo de PCR utilizado para la amplificación de regiones CRISPR menores a 5000 pb se realizó en un volumen total de 50 μ l, conteniendo 5 μ l de *buffer* de PCR 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl) (Roche), 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM (Roche), 200 μ M de cada dNTP, 2,5 U de DNA *Taq* polimerasa (Roche), y 1 μ M de cada uno de los *primers* correspondientes, ya sea *csnF/crisprR* o *casF/casR*. El ensayo de PCR utilizado para regiones CRISPR mayores a 5000 pb también se realizó en un volumen total de 50 μ l, conteniendo 5 μ l de *buffer* de PCR 5X (*Phusion HF Buffer*, Thermo Fisher Scientific), 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM (Thermo Fisher Scientific), 200 μ M de cada dNTP, 2,5 U de DNA *Taq* polimerasa (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerases*, Thermo Fisher Scientific) y 1 μ M de cada uno de los *primers* *hipoF/cobalR*. Las condiciones de PCR fueron:

- ***Primers csnF/crisprR* o *casF/casR***: ciclo inicial de 3 min a 94 °C seguido de 38 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 45 °C durante 20 s (hibridación) y 72 °C durante 2 min (extensión).
- ***Primers hipof/cobalR***: ciclo inicial de 3 min a 94 °C seguido de 38 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización), 48 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 5 min (extensión).

Todos los programas finalizaron con un ciclo a 72 °C durante 10 min (elongación final). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5 % m/v) en presencia de bromuro de etidio y posterior visualización en transiluminador (UV). Los amplificadores de las cepas fueron purificados utilizando el *kit GenElute™ PCR Clean-Up*

(Sigma Aldrich) y secuenciados en un equipo ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* en el Servicio Técnico de Investigación (Universidad de Alicante, España).

7.4. Obtención de derivados fagorresistentes a partir de cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*

Las cepas sensibles a fagos *Lb. paracasei* BL23, *Lb. paracasei* A13, *Lb. paracasei* A14, *Lb. paracasei* A, *Lb. paracasei* ATCC 27092, *Lb. paracasei* Yk y *Lb. paracasei* ATCC 27139 fueron inoculadas al 1 % (v/v) en caldo MRS-Ca e infectadas con una suspensión fágica de alto título de cada uno de los fagos C_L1, iLp84 e iLp1308 (Mercanti y col., 2015), PL-1 (Capra y col., 2011), MLC-A (Capra y col., 2006a) y con un cóctel formado por la combinación de dichos fagos, a diversas dosis infectivas (m.o.i. entre 0,02 y 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 se lisaron completamente en el transcurso del día, y que evidenciaron desarrollo posterior, luego de 1 a 7 días a 37 °C. Seguidamente, esos cultivos se estriaron en placas de agar MRS, se incubaron (48 h, 37 °C) y se aislaron clones a partir de las colonias obtenidas (Callegari, 1992; Carminati y col., 1993; Briggiler Marcó y col., 2011).

Para determinar si la fagorresistencia de los derivados obtenidos estaba ligada al sistema CRISPR, fue necesario detectar la presencia de nuevos espaciadores entre la región líder y la primera repetición. Para ello se diseñaron *primers* cercanos a la secuencia líder a partir de los arreglos CRISPR secuenciados (Sección 7.3.3) durante esta Tesis (crisprF: 5'-TTGACGAGGACTTCGTTGAC-3' y crisprR: 5'-TGCAATCGGTGAAAGTATCGC-3').

7.4.1. Análisis de las regiones CRISPR de los derivados fagorresistentes

Se extrajo el ADN bacteriano a partir de los derivados fagorresistentes aislados y de mezclas compuestas por 20 derivados resistentes. Esto último con el fin de aumentar la probabilidad de evidenciar la adquisición de un nuevo espaciador. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito en la Sección 7.3.2, y se utilizaron los oligonucleótidos crisprF y crisprR *primers* descritos en la Sección 7.4.

El ensayo de PCR utilizado para la amplificación de regiones CRISPR, se realizó en un volumen total de 50 μ l, conteniendo 5 μ l de *buffer* de PCR 10X (200 mM Tris-HCl de pH 8,4, 500 mM KCl) (Roche), 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM (Roche), 200 μ M de cada dNTP, 2,5 U de DNA *Taq* polimerasa (Roche), y 1 μ M de cada uno de los *primers*. Las condiciones de PCR fueron: ciclo inicial de 3 min a 94 °C seguido de 38 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 45 °C durante 20 s (hibridación) y 72 °C durante 2 min (extensión). El programa finalizó con un ciclo a 72 °C durante 10 min (elongación final). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5 % m/v) en presencia de bromuro de etidio. Los perfiles de amplificación fueron observados en un transiluminador UV, fotografiados y guardados como archivos TIFF.

7.5. Aislamiento de derivados fagoresistentes de *Lactobacillus paracasei* BL23 con el sistema CRISPR-Cas activo

Debido a la dificultad de aislar derivados fagoresistentes que hayan adquirido nuevos espaciadores durante los eventos de infección fágica, se planteó un ensayo alternativo. Para el mismo, se utilizó la cepa *Lb. paracasei* BL23 como modelo, ya que contiene el sistema CRISPR-Cas en su genoma y no posee plásmidos que interfieran en la transformación. Durante el estudio, *Lb. paracasei* BL23 fue transformada con el plásmido pEM76 (Martín y col., 2000), al que se le incorporó el arreglo CRISPR de la cepa *Lb. rhamnosus* GG. Dicho arreglo CRISPR está formado por una secuencia líder, repeticiones y espaciadores con una similitud mayor al 90 % del genoma del fago J-1 (Capra y col., 2011), específico y lítico de *Lb. paracasei*. La incorporación de dicho fragmento y la posterior infección con el fago J-1, podría permitir aislar aquellos derivados de *Lb. paracasei* BL23 que posean el sistema CRISPR activo. Estos ensayos fueron iniciados en la Universidad de Alicante y se continúan actualmente en el INLAIN.

7.5.1. Amplificación de la región CRISPR de *Lactobacillus rhamnosus* GG

Un cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* GG desarrollado durante 16-18 h a 37 °C en 5 ml de caldo MRS, fue centrifugado a 6000 *g* durante 15 min (4 °C). El *pellet* fue lavado con agua Milli-Q® estéril y se procedió a la extracción de ADN de igual manera que en la Sección 7.3.2.

Para la amplificación del arreglo CRISPR, se utilizaron los *primers* rhaF (5'-AAAGGAATTCCACCTGAGACGAGGCATGTTAG-3') y rhaR (5'-AACGGGATCCCGTCGGATGTGCAACGTAGAAAGT-3'). Dichos *primers* fueron diseñados utilizando la herramienta de diseño de *primers* de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), teniendo en cuenta que en su extremo 5' debían contener una secuencia específica para las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, y un mínimo de 3 bases adicionales en los extremos para que pudieran ser cortados por dichas enzimas.

El ensayo de PCR utilizado para la amplificación se realizó en un volumen total de 50 µl, conteniendo 5 µl de *buffer* de PCR 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 y 500 mM KCl) (Roche), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Roche), 200 µM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), y 1 µM de cada uno de los *primers*. Las condiciones de PCR fueron: ciclo inicial de 3 min a 94 °C seguido de 12 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización), 50 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 2 min (extensión); luego se realizaron 30 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización), 55 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 2 min (extensión). El programa finalizó con un ciclo a 72 °C durante 10 min (elongación final). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa *low melting* (1,5 % m/v) en presencia de bromuro de etidio. La banda esperada (1850 pb), fue cortada y purificada con el *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

7.5.2. Plásmido empleado

El plásmido pEM76 (Martín y col., 2000), fue utilizado para el aislamiento de derivados fagorresistentes a partir de *Lb. paracasei* BL23. Dicho plásmido contiene un origen de replicación de *Escherichia coli* (*ori*), genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap) y a eritromicina (Em) y una región de integración al cromosoma del bacteriofago A2 (*int-attP*) (Figura 12).

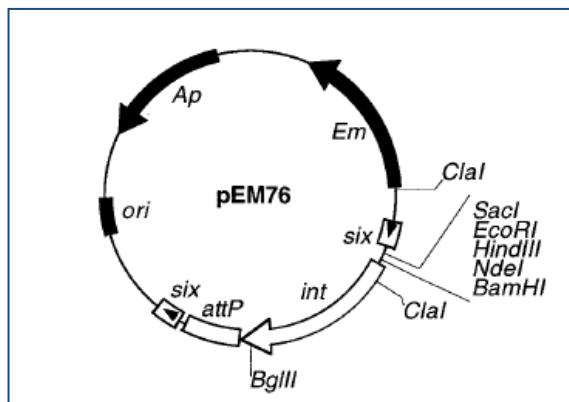


Figura 12. Estructura del plásmido pEM76 (Martín y col., 2000).

7.5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN (plásmido pEM76 y amplificado de la región CRISPR de *Lb. rhamnosus* GG) con enzimas de restricción, se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas entre 1 y 5 U de enzima por cada μg de ADN a digerir, en un volumen final que varió entre 20 y 50 μl , dependiendo de la cantidad de ADN. Las enzimas utilizadas fueron EcoRI y BamHI (Roche).

7.5.4. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN (plásmido pEM76 y amplificado de la región CRISPR de *Lactobacillus rhamnosus* GG) se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 μl y empleando la solución *buffer* de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1 respectivamente. La incubación se realizó durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$.

7.5.5. Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de células competentes de *Escherichia coli* Top10 (GIBCO-BRL) se realizó según se indica a continuación. Las células bacterianas se cultivaron 12 h en medio Luria-Bertani (LB: peptona de carne 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l) en ausencia de antibióticos a 37 °C con agitación (180 rpm). Con este cultivo saturado se realizó un repique 1/100 en medio LB fresco y se dejó crecer durante 2-3 h, hasta una $D.O._{600nm} = 0,5$ aproximadamente. Las células se centrifugaron (2500 g, 20 min, 4 °C) y el *pellet* se lavó con agua destilada a 4 °C. Se realizaron tres lavados y el *pellet* se dejó reposar 15 min en hielo entre cada lavado. El *pellet* final fue resuspendido en 2 ml de glicerol 10 % y se fraccionaron alícuotas de 50 µl. Cada alícuota fue adicionada de 2 µl de reacción de ligación (plásmido). Las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (Eppendorf 2510). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y se incubó 1 h a 37 °C. Después de centrifugar (4000 g, 5 min, 4 °C), el *pellet* se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml, Sigma). Luego del desarrollo de colonias, se realizó minipreparación de ADN plasmídico utilizando el *kit* comercial *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se analizaron por PCR, utilizando los *primers* p76F (5'-AAGTAGCACTCGCAGATTGG-3') y p76R (5'-CATTCACTTTGGTCGGTGGG-3') (Martín y col., 2000). Las condiciones de PCR fueron: ciclo inicial de 3 min a 94 °C seguido de 38 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 45 °C durante 20 s (hibridación) y 72 °C durante 2 min (extensión). Los clones positivos y los plásmidos purificados se guardaron en agua estéril a -80 °C. Los clones fueron conservados con la adición de glicerol 20 % (v/v) y el antibiótico correspondiente.

7.5.6. Transformación de *Lactobacillus paracasei* BL23 con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de células competentes de *Lb. paracasei* BL23 se detalla a continuación. Las células bacterianas se cultivaron 12 h en 10 ml de medio MRS con glicina al 1 % a 37 °C. El cultivo se centrifugó (5000 *g*, 5 min, 4 °C), el *pellet* se resuspendió en 100 ml de MRS con glicina 1 %, previamente atemperado. Luego se incubó a 37 °C durante 1 h y se centrifugó (5000 *g*, 15 min, 4 °C). El *pellet* se lavó con 50 ml de agua bidestilada fría y nuevamente se centrifugó (5000 *g*, 15 min, 4 °C). Este paso se repitió 3 veces, el *pellet* se dejó reposar 15 min en hielo entre cada lavado. El *pellet* final fue resuspendido en 2 ml de PEG 1500 (30 % m/v) frío y se fraccionaron alícuotas de 50 µl. Cada alícuota fue adicionada de 2 µl de plásmido. Las condiciones de electroporación empleadas fueron 2500V/25/400Ω. El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio MRS a la suspensión de células y se incubó 1 h a 37 °C. Después de centrifugar (4000 *g*, 5 min, 4 °C) el *pellet* se resuspendió en 100 µl de medio MRS y se sembró en agar MRS suplementado con ampicilina (100 µg/ml, Sigma).



RESULTADOS

RESULTADOS

1. Identificación y diversidad de cepas de *Leuconostoc*

La amplificación y la posterior secuenciación de los genes de la región 16S del ADNr permitió identificar 7 de las 8 cepas como *Leuconostoc mesenteroides* (C19A, C19B, CyC, D4, D4b, D6a y L79-1) y la restante como *Leuconostoc pseudomesenteroides* (cepa R707). Por otro lado, a partir de los perfiles obtenidos mediante RAPD-PCR usando los *primers* M13 y 1254, se construyó un único dendrograma (Figura 13), que permitió evaluar la diversidad genética entre las cepas en estudio. La reproducibilidad de la técnica RAPD-PCR para los dos *primers* utilizados fue del 90 %, y se determinó mediante la comparación de los perfiles RAPD-PCR de la cepa R707 con su duplicado. Por lo tanto, un porcentaje de similitud menor al 90 % indica diferencias genéticas entre las cepas. En base a esto, fue posible identificar 5 *clusters*, conformados de la siguiente manera: 1) D4 y L79-1; 2) CyC; 3) D6a y D4b; 4) C19A y C19B y 5) R707. Los perfiles RAPD obtenidos para la única cepa identificada como *Leuconostoc pseudomesenteroides* (R707) fueron claramente distintos (similitud menor al 10 %) a aquellos observados para las cepas identificadas como *Leuc. mesenteroides* que revelaron, a su vez, una similitud mayor al 60 %.

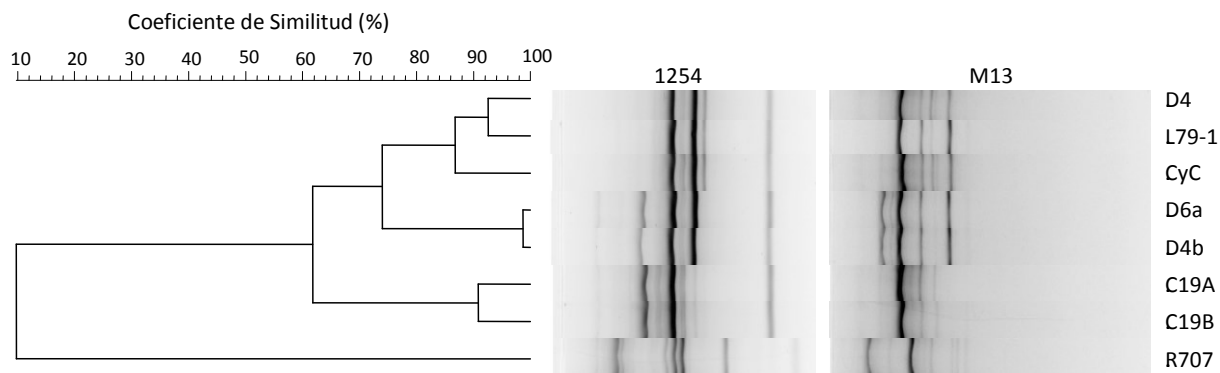


Figura 13. Dendrograma obtenido por comparación (BioNumerics™ V 6.0, Applied Maths BVBA, Bélgica) y reagrupamiento (UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) de los perfiles RAPD-PCR de cepas de *Leuconostoc*, sensibles a fagos, usando los primers M13 y 1254.

2. Caracterización de bacteriofagos

2.1. Caracterización molecular

2.1.1. Perfiles de restricción

En base al dendrograma que resultó de la combinación de los perfiles de restricción obtenidos con XhoI, ClaI, HindIII y EcoRV, los fagos estudiados se agruparon en 6 *clusters* distintos (Figura 14). Por un lado, los fagos CyC1, CyC2, Ln-6 y Ln-9 compartieron el mismo patrón (99 % de similitud), en tanto que los perfiles de restricción obtenidos para los fagos Ln-7 y Ln-8 resultaron muy similares (84 % de similitud), a excepción de una banda de 4 kb que se observó (Ln-8) cuando los fagos fueron cortados con EcoRV y HindIII. Por otro lado, los fagos CHA, CHB y LDG mostraron perfiles claramente distintivos. En base a los 6 *clusters* identificados, se seleccionó un fago de cada uno de ellos para los posteriores estudios.

Para todos los fagos, la sumatoria de los tamaños de los fragmentos obtenidos, permitió estimar el tamaño del genoma entre 27 kb y 30 kb.

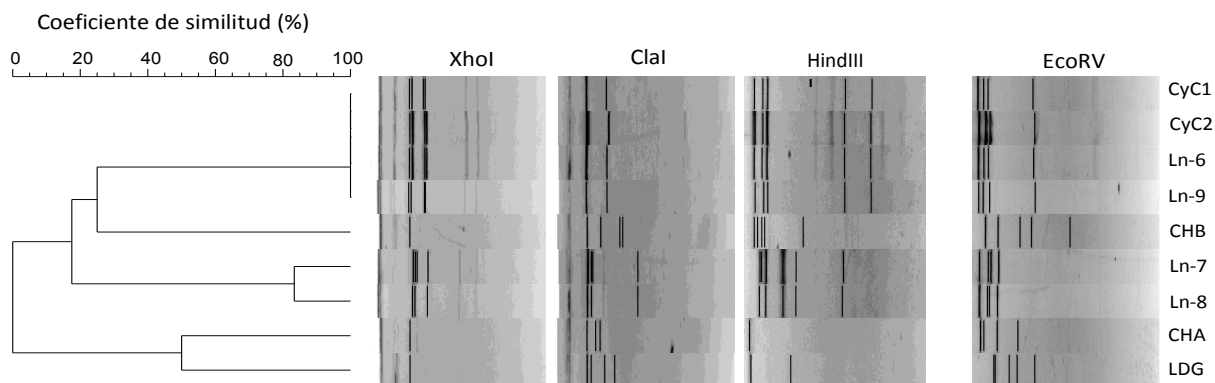


Figura 14. Perfiles de restricción de los fagos de *Leuconostoc* en estudio, obtenidos con las enzimas XhoI, ClaI, HindIII y EcoRV. El reagrupamiento se realizó con el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*).

2.1.2. Secuenciación de los genomas fágicos

Mediante la secuenciación de los fagos LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9, fue posible determinar con precisión los tamaños de los genomas y el contenido de GC de los mismos. Los seis fagos secuenciados presentaron un genoma formado por ADN lineal de doble cadena, con un tamaño que osciló entre 26,5 y 28,9 kb y con un contenido de GC que fue de 36 % para todos los fagos.

Por otro lado, a través del análisis de las secuencias se observó que todos los fagos presentaron un mecanismo de empaquetamiento del ADN genómico del tipo *cos*, siendo la secuencia de los extremos cohesivos 5'-GGTTAATAGTAGTCTTTTTGAA-3' para CHA, CHB, Ln-7 y Ln-8, 5'-GGTTAATAGTAGTCTTTTTTAA-3' para Ln-9 y 5'-TCGTGCAATAGTAGCGTTTTAA-3' para el fago LDG.

El análisis bioinformático de los genomas (mediante las herramientas ORF finder y GeneMark), reveló la presencia de 43, 45, 47, 45, 48 y 40 ORFs para los fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8, Ln-9 y LDG, respectivamente (Tablas 4 a 9, respectivamente). Aproximadamente el 50 % de los ORF presentó la misma orientación. En la mayoría de los genomas fágicos estudiados, los codones de inicio correspondieron a ATG (95 %) y GTG (5 %), mientras que para el genoma del fago LDG, los codones de inicio identificados fueron ATG (95 %), GTG (2,5 %) y ATT (2,5 %).

De acuerdo al grado de similitud revelado por los fagos secuenciados, se los clasificó en dos **Grupos (1 y 2)**, que presentaron gran diferencia en su secuencia nucleotídica (Figura 15).

Los genomas de los fagos secuenciados en este estudio, y que formaron parte del **Grupo 1** (fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9), mostraron una similitud mayor al 90 % con diversos fagos que infectan cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Por su parte, el genoma del fago LDG, incluido en el **Grupo 2**, mostró 90 % de similitud con fagos infectivos de cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Paralelamente, se construyó un árbol filogenético utilizando el programa Gegenees (versión 2.2.1) a partir de 28 genomas de fagos que infectan BAL, incluyendo fagos de *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Figura 16). De acuerdo a los valores ANI (*Average Nucleotide Identity*), los fagos de *Leuconostoc* también se agruparon en dos *clusters* (I y II). Como puede observarse en el árbol filogenético, dentro del *cluster* I, pudieron identificarse 2 *subclusters* (A y B). Los fagos Ln-7 y Ln-8, pertenecientes al *subcluster* A, mostraron alta similitud entre sí (valor ANI mayor al 92 %) y con el fago ϕ LN25 (valor ANI mayor al 84 %) (Kot y col., 2014). Un total de 27 y 26 ORFs de los fagos Ln-7 y Ln-8, respectivamente, mostraron homología con secuencias nucleotídicas almacenadas en GenBank, que poseen una función proteica conocida. Por otro lado, 20 y 19 ORFs de los fagos Ln-7 y Ln-8, respectivamente, evidenciaron similitudes con genes cuya función es desconocida hasta el momento (Tablas 6 y 7, respectivamente). El fago Ln-9, incluido también en el *subcluster* A, presentó una similitud mayor al 57 % con el fago 1-A4 (Lu y col., 2010). Un total de 25 ORFs mostraron homología con genes previamente caracterizados. Por otro lado, 18 ORFs revelaron similitudes con genes cuya función no se conoce hasta el momento. Finalmente, 5 ORFs no presentaron similitudes con ningún gen almacenado en las bases de datos (Tabla 8).

Por su parte, los fagos del *subcluster* B (CHA y CHB) secuenciados en este trabajo, presentaron un valor ANI mayor al 92 % entre sí y un valor ANI superior al 91 % con los fagos LN34, LNTR3 y LNTR2 (Kot y col., 2014) (Figura 16). La comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas, con aquellas almacenadas en bases de datos públicas (GenBank), reveló que 24 y 26 ORFs deducidos a partir de los fagos CHA y CHB, respectivamente, mostraron homología con genes previamente caracterizados. Adicionalmente, 19 ORFs de los fagos CHA y CHB presentaron similitud con genes con función desconocida hasta el momento (Tablas 4 y 5, respectivamente).

El fago LDG mostró una alta similitud (valor ANI mayor al 62 %) con los fagos que pertenecen al *cluster* II (Figura 16). Un total de 25 ORFs de este fago mostró homología con genes previamente caracterizados, y 15 ORFs evidenciaron similitudes con genes cuya función es aún desconocida (Tabla 9).

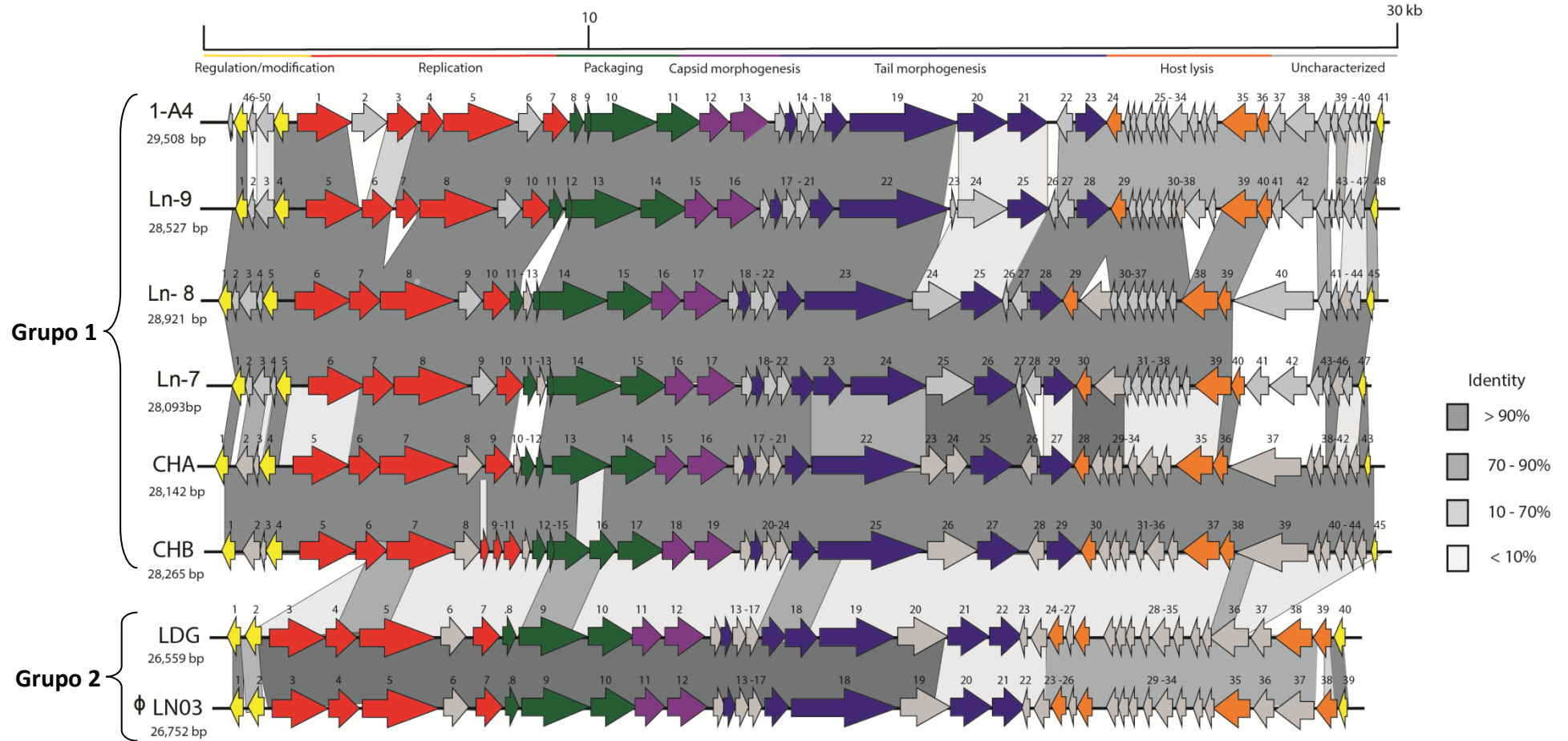


Figura 15. Representación esquemática de la comparación genómica de ocho fagos de *Leuconostoc*. Los ORFs se indican mediante flechas de colores numeradas. Las flechas representan proteínas putativas y su color indica el módulo correspondiente. Los ORFs conectados por un cuadro gris muestran la identidad a nivel de aminoácidos; la tonalidad de gris indica el porcentaje de identidad. Los ORFs no caracterizados se muestran como flechas de color gris.

Tabla 4. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago de *Leuconostoc* CHA y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start	Stop	Size ^a (aa)	MM ^b (kDa)	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d (5'-TAGGAGGT-3')	Predicted function ^e	Best match (% amino acid identity) ^f
1	683	381	101	11,6	7,7	ACAAGGataattaatATG	phage HNH endonuclease	ORF1 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR2) (100 %)
2	1122	685	146	16,7	7,0	AAGAGGtactaaaaaATG	phage-related protein	ORF2 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN34) (100 %)
3	1265	1119	49	6,1	11,3	AGGAGCGaagaagaaATG	hypothetical protein	ORF3 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN34) (100 %)
4	1636	1262	125	14,8	7,8	AGGAGGgtaacatATG	endodeoxyribonuclease	ORF4 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (99 %)
5	2018	3331	438	50,5	5,5	AGGAGGaaaacagatATG	DNA helicase	ORF5 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
6	3328	4083	252	29,1	6,1	none	DNA primase/polymerase	ORF6 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN34) (100 %)
7	4162	5997	612	69,7	7,1	AGGAGAaaaaagattATG	DNA polymerase	ORF7 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (99 %)
8	6187	6759	191	21,7	5,6	AGGAGAacatatATG	hypothetical protein	ORF8 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
9	6812	7444	211	24,1	5,9	GGGAGGaattaaagtATG	hydrolase	ORF9 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
10	7456	7638	61	7,2	5,2	AGGAGGattgactATG	hypothetical protein	ORF10 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (98 %)
11	7647	7973	109	12,4	5,0	ATGAGGtaatatATG	terminase small subunit	ORF11 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
12	8035	8193	53	5,9	11,3	none	terminase small subunit	ORF12 (<i>Leuc. phage</i> Ln-9) (95 %)
13	8177	9823	549	62,9	5,1	AGGAGGgtaatagATG	terminase large subunit	ORF12 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
14	9836	10957	374	43,0	5,0	AGGAGAaaactatATG	portal protein	ORF13 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (99 %)
15	10917	11642	242	26,2	4,5	AGGAGAcactacgaATG	phage prohead protease	ORF14 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
16	11694	12647	318	34,8	5,2	AGGAGAcctataatATG	major capsid protein	ORF15 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
17	12777	13064	96	10,8	4,3	AGGAGGtgacacaATG	hypothetical protein	ORF16 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
18	13051	13317	89	10,2	10,0	AGGAGGcgatcagatATG	phage tail protein	ORF17 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
19	13317	13634	106	12,3	4,6	GGGAGGtagtcattatATG	hypothetical protein	ORF18 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
20	13631	13960	110	12,4	11,1	AGGTGTtaatatATG	hypothetical protein	ORF19 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
21	14009	14590	194	21,2	4,7	AGGAGAattaatcaattATG	major tail protein	ORF20 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
22	14657	17398	914	93,2	9,2	AGAAAGGaaatgtattatATG	tail tape measure protein	ORF21 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (99 %)
23	17462	18163	234	27,2	4,8	AGAATGGaggaattatATG	hypothetical protein	ORF22 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
24	18168	18785	206	23,0	5,1	none	hypothetical protein	ORF22 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)

25	18788	19786	333	36,7	5,1	AGGAGAttaatc ATG	structural protein	ORF23 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (99 %)
26	20394	19993	134	15,6	4,7	AGGAGAAattaagac ATG	hypothetical protein	ORF24 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
27	20474	21241	256	27,9	5,9	GAGGAGAtttaaaat ATG	receptor-binding protein	ORF25 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (98 %)
28	21274	21645	124	14,0	6,4	AGGAGAccccgatt ATG	holin_I	ORF26 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (99 %)
29	21920	21756	55	6,4	8,1	AGGAGAAgta ATG	hypothetical protein	ORF27 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
30	22150	21920	77	9,0	6,8	TGGAGGTtctata G TG	gag-pol polyprotein	ORF28 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
31	22383	22150	78	9,1	5,5	AGGAACGAgaaa ATG	hypothetical protein	ORF29 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
32	22504	22373	44	5,4	5,0	none	hypothetical protein	ORF35 (<i>Leuc. phage</i> Ln-9) (91 %)
33	22709	22491	73	9,0	8,0	GAGAGGttcgcaagt AATG	hypothetical protein	ORF30 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (99 %)
34	23209	22709	167	18,7	9,5	AGGAGAtttaaa ATG	phage-related hydrogenase	ORF31 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (95 %)
35	24449	23577	291	31,0	4,9	AGGAGGacaagtaac ATG	lysine	ORF33 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
36	24771	24424	116	12,8	9,3	AGGAGGaaacaataa ATG	holin_II	ORF34 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN34) (100 %)
37	26299	24788	504	55,9	5,4	AGGAGGaaattac ATG	hypothetical protein	ORF36 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR2) (98 %)
38	26507	26361	49	5,6	5,1	AGGGGTattgt AATG	hypothetical protein	ORF36 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (98 %)
39	26815	26507	103	11,6	9,5	AGGAGAtataac ATG	hypothetical protein	ORF37 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN34) (98 %)
40	27017	26817	67	7,8	4,9	none	hypothetical protein	ORF38 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)
41	27298	27020	93	10,7	4,5	TGAGGaaagtgagcaa ATG	hypothetical protein	ORF39 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (98 %)
42	27546	27295	84	9,8	5,1	ACGAGGagataacaa ATG	hypothetical protein	ORF40 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (98 %)
43	27862	27692	57	6,5	6,1	AGGAATaatatgac ATG	repressor	ORF41 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR3) (100 %)

^a Número de aminoácidos de la proteína. ^b Tamaño de la proteína (kDa). ^c Punto isoelectrico de la proteína (pI). ^d RBS: *Ribosome Binding Site*. Nucleótidos en letra mayúscula son idénticos a la secuencia del RBS. Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio. Codón de inicio (*Start codon*): nucleótidos en letra mayúscula y en negrita. ^e Función putativa. ^f Proteína que evidenció mayor identidad con la secuencia dada.

Tabla 5. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago de *Leuconostoc* CHB y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start	Stop	Size ^a (aa)	MM ^b (kDa)	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d (5'-TAGGAGGT-3')	Predicted function ^e	Best match (% amino acid identity) ^f
1	672	370	100	11,6	7,7	ACAAGGataattaatATG	phage HNH endonuclease	ORF1 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN2) (100 %)
2	1111	674	145	16,7	7,0	AAGAGGtactaaaaaATG	phage-related protein	ORF2 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (100 %)
3	1254	1108	48	6,1	11,3	AGGAGCGaagaagaaATG	hypothetical protein	ORF3 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (100 %)
4	1625	1251	124	14,8	7,8	AGGAGGgtaacatATG	endodeoxyribonuclease	ORF4 (<i>Leuc.</i> phage Φ LNTR3) (99 %)
5	2007	3320	437	50,5	5,5	AGGAGGaaaacagatATG	DNA helicase	ORF5 (<i>Leuc.</i> phage Φ LNTR3) (100 %)
6	3317	4072	251	29,1	6,1	none	DNA primase/polymerase	ORF6 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (99 %)
7	4151	5986	611	69,7	7,1	AGGAGAaaaaagattATG	DNA polymerase	ORF7 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (99 %)
8	6176	6748	190	21,7	5,6	AGGAGAcacatatATG	hypothetical protein	ORF8 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (100 %)
9	6745	6918	57	6,6	6,4	none	HNH endonuclease	ORF40 (<i>Lc.</i> phage Φ43) (39 %)
10	6915	7088	57	6,0	5,3	GGGAGGaattaaagtATG	hydrolase	ORF9 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR3) (89 %)
11	7057	7548	163	18,9	6,2	none	hydrolase	ORF10 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR3) (99 %)
12	7560	7742	60	7,2	5,2	AGGAGGattgactATG	hypothetical protein	ORF10 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR3) (100 %)
13	7751	8077	108	12,4	5,0	ATGAGGtaatatATG	terminase small subunit	ORF11 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR3) (100 %)
14	8139	8297	52	5,9	11,3	none	terminase small subunit	ORF11 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (97 %)
15	8281	9243	320	36,8	5,9	AGGAGGgtaatagATG	terminase large subunit	ORF13 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR2) (99 %)
16	9260	10054	264	30,1	4,8	none	terminase large subunit	ORF13 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR2) (99 %)
17	10067	11188	373	43,0	5,0	AGGAGAaaactatATG	portal protein	ORF13 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (99 %)
18	11148	11840	230	25,1	4,5	AGGAGAcactacgaATG	phage prohead protease	ORF14 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNT34) (98 %)
19	11892	12845	317	34,8	5,2	AGGAGAcctataatATG	major capsid protein	ORF15 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (99 %)
20	12960	13232	90	10,8	4,3	AGGAGGtgacacaATG	hypothetical protein	ORF16 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (100 %)
21	13222	13500	92	10,2	10,0	AGGAGGcgatcagatATG	phage tail protein	ORF17 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (100 %)
22	13500	13817	105	12,3	4,6	GGGAGGtagtcatttaATG	hypothetical protein	ORF18 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (100 %)
23	13814	14143	109	12,4	11,1	AGGTGTaatattATG	hypothetical protein	ORF19 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (100 %)
24	14192	14773	193	21,2	4,7	AGGAGAattaatcaattATG	major tail protein	ORF21 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (98 %)

25	14926	17637	903	93,2	9,2	AGAAAGGaaatgtattat ATG	phage tail tape measure protein	ORF22 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (99 %)
26	17701	18897	398	27,2	4,8	AGAATGGaggaattat ATG	hypothetical protein	ORF22 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR2) (94 %)
27	18900	19898	332	36,7	5,1	AGGAGAttaatc ATG	structural protein	ORF24 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (99 %)
28	20105	20506	133	15,6	4,7	AGGAGAattaagac ATG	hypothetical protein	ORF25 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (98 %)
29	21353	20586	255	27,9	5,9	GAGGAGAttaaaat ATG	receptor-binding protein	ORF25 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (99 %)
30	21757	21386	123	14,0	6,4	AGGAGAccccgcatt ATG	holin_I	ORF26 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (100 %)
31	22032	21868	54	6,4	8,1	AGGAGAagta ATG	hypothetical protein	ORF27 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR3) (100 %)
32	22262	22032	76	9,0	6,8	TGGAGGTtctata GTG	hypothetical protein	ORF28 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (98 %)
33	22495	22262	77	9,1	5,5	AGGAACGAgaaa ATG	hypothetical protein	ORF29 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR3) (100 %)
34	22616	22485	43	5,4	5,0	none	hypothetical protein	ORF35 (<i>Leuc. phage</i> Ln-9) (91 %)
35	22821	22603	72	9,0	8,0	GAGAGTtcgcaagt AATG	hypothetical protein	ORF32 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (100 %)
36	23321	22821	166	18,7	9,5	AGGAGAttaaa ATG	phage-related hydrogenase	ORF31 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR2) (99 %)
37	24534	23689	281	31,0	4,9	AGGAGGacaagtaac ATG	lysine	ORF33 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (100 %)
38	24883	24536	115	12,8	9,3	AGGAGGaaacaataa ATG	holin_II	ORF34 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (91 %)
39	26411	24900	503	55,9	5,4	AGGAGGaaattac ATG	hypothetical protein	ORF35 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (99 %)
40	26619	26473	48	5,6	5,1	AGGGGTattgt AATG	hypothetical protein	ORF36 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR3) (100 %)
41	26927	26619	102	11,6	9,5	AGGAGAtataac ATG	hypothetical protein	ORF37 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (99 %)
42	27129	26929	66	7,8	4,9	none	hypothetical protein	ORF38 (<i>Leuc. phage</i> Φ LN34) (91 %)
43	27410	27132	92	10,7	4,5	TGAGGaaagtgagcaa ATG	hypothetical protein	ORF39 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR3) (100 %)
44	27658	27407	83	9,8	5,1	ACGAGGagataacaa ATG	hypothetical protein	ORF41 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR3) (100 %)
45	27974	27804	56	6,5	6,1	AGGAATaatatgac ATG	repressor	ORF40 (<i>Leuc. phage</i> Φ LNTR3) (100 %)

^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 letra mayúscula son idénticos a la secuencia del RBS. Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio. Codón de inicio (*Start codon*): nucleótidos en letra mayúscula y en negrita. ^e Función putativa. ^f Proteína que evidenció mayor identidad con la secuencia dada.

Tabla 6. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago de *Leuconostoc* Ln-7 y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start	Stop	Size ^a (aa)	MM ^b (kDa)	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d (5'-TAGGAGGT-3')	Predicted function ^e	Best match (% amino acid identity) ^f
1	566	264	100	11,6	8,3	TAGGAGGTttaaagATG	phage HNH endonuclease	ORF1 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
2	755	579	58	6,9	9,4	AAGGATAAttaaATG	hypothetical protein	ORF2 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
3	1194	757	145	16,7	6,9	GAGAGGTatcaaaaaATG	phage-related protein	ORF3 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
4	1337	1191	48	5,9	12,0	AAGGAGCAaaaaagaaATG	hypothetical protein	ORF4 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
5	1708	1334	124	14,9	7,8	CAGGAGGAtaataATG	endodeoxyribonuclease	ORF5 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
6	2133	3485	450	52,1	5,3	CAGGAGGAaacgctaATG	DNA helicase	ORF6 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
7	3482	4231	249	28,7	5,6	AAAGGGTTgacgaATG	DNA primase/polymerase	ORF7 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
8	4240	6075	611	69,7	6,7	TAGGAGTAatcATG	DNA polymerase	ORF8 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
9	6133	6705	190	21,6	4,9	AAGGAGAAtttataATG	hypothetical protein	ORF9 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
10	6758	7390	210	24,0	5,6	AGGGAGGAattaaatATG	hydrolase	ORF10 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (99 %)
11	7402	7728	108	12,5	5,2	TAGGAGGTaaataATG	terminase small subunit	ORF11 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
12	7739	7936	65	7,8	9,2	TAGGAGGTTTTATG	hypothetical protein	ORF12 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
13	8001	8159	52	5,9	10,1	AAAATCATtccccagtATG	terminase small subunit	ORF13 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
14	8143	9789	548	63,0	5,1	AAGGAGGGtaataagATG	terminase large subunit	ORF13 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
15	9802	10923	373	43,0	4,9	AAGGAGAAaactatATG	portal protein	ORF15 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
16	10883	11608	241	26,2	4,3	CAGGAGACactacgaATG	phage prohead protease	ORF16 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
17	11653	12015	120	34,7	5,2	AAGGAGACtataatATG	major capsid protein	ORF17 (<i>Leuc.</i> phage Ln-9) (100 %)
18	12703	13035	110	10,4	4,3	TAGGAGGTgacacaATG	hypothetical protein	ORF18 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
19	13025	13303	92	10,6	10,1	GAGGAGGCgattagatATG	phage tail protein	ORF18 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
20	13303	13620	105	12,3	4,6	GGGAGGTTaatcatttaATG	hypothetical protein	ORF20 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (99 %)
21	13617	13946	109	12,4	10,9	AGACAGGTgtaataatATG	hypothetical protein	ORF21 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
22	13995	14576	193	21,3	4,8	AAGGAGAAttaatcaattATG	major tail protein	ORF22 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (100 %)
23	14650	15543	297	30,5	9,1	AAGGAAATgtattatATG	tail tape measure protein	ORF23 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (98 %)
24	15554	17344	596	60,3	5,1	none	tail tape measure protein	ORF23 (<i>Leuc.</i> phage Ln-8) (99 %)

25	17408	18604	398	45,5	4,7	ATGGAGGAaattat ATG	hypothetical protein	ORF24 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
26	18502	19500	332	36,9	4,8	TAGGAGATaatc ATG	structural protein	ORF25 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (99 %)
27	19631	19515	38	5,4	9,8	AAGGTGGTtctaaatactatagt GTG	hypothetical protein	ORF26 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (98 %)
28	20109	19708	133	15,8	4,8	AAGGAGAAttaaagac ATG	hypothetical protein	ORF27 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
29	20295	21059	254	27,9	7,8	GAGGAGATctaaaaa ATG	receptor-binding protein	ORF28 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (99 %)
30	21462	21091	123	14,0	6,4	AAGGAGACcccacatt ATG	holin_I	ORF27 (<i>Leuc. phage ΦLN25</i>) (100 %)
31	22266	21529	245	28,9	4,9	AAGGAGATggggtt ATG	type I restriction-modification system	ORF30 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
32	22427	22263	54	6,4	8,1	TGGGAGAGaagta ATG	hypothetical protein	ORF31 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
33	22696	22427	89	10,2	9,0	AAGGAGAAAacaa ATG	putative gag-pol polyprotein	ORF32 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
34	22932	22693	79	9,3	9,5	ATTGAGGTattata ATG	hypothetical protein	ORF31 (<i>Leuc. phage ΦLN25</i>) (100 %)
35	23168	22932	78	9,1	6,8	AAGGGAAAccatt ATG	hypothetical protein	ORF32 (<i>Leuc. phage ΦLN25</i>) (100 %)
36	23373	23158	71	8,9	7,9	AGAGAGGTtcgcaagta ATG	hypothetical protein	ORF33 (<i>Leuc. phage ΦLN25</i>) (100 %)
37	23624	23373	83	8,7	9,8	AAGGAGAAAacaa ATG	phage-related hydrogenase	ORF36 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
38	23821	23699	40	6,0	8,6	AAAGAGGAacaaac GTG	hypothetical protein	ORF37 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
39	24872	23991	293	31,5	6,2	AAGGAGGAaaagta ATG	lysine	ORF36 (<i>Leuc. phage ΦLN25</i>) (100 %)
40	25221	24874	115	12,6	9,3	ATGGAGGAcacatt ATG	holin_II	ORF39 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
41	25594	25238	118	12,7	4,1	AGGAGAATactt ATG	hypothetical protein	ORF39 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (56 %)
42	26353	25607	248	26,0	7,8	none	baseplate protein	ORF38 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (56 %)
43	26735	26418	105	12,0	5,6	AAGGAGATataaa ATG	hypothetical protein	ORF41 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (99 %)
44	26937	26737	66	7,8	4,6	TATGTGGTaaatgtg ATG	hypothetical protein	ORF42 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (98 %)
45	27227	26940	95	11,3	6,3	GAGGAAGTgagcaa ATG	hypothetical protein	ORF43 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
46	27475	27224	83	9,9	4,2	AGGGAGATAacaa ATG	hypothetical protein	ORF44 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)
47	27791	27621	56	6,4	6,2	AAGGAAATaatatgac ATG	repressor	ORF45 (<i>Leuc. phage Ln-8</i>) (100 %)

^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 letra mayúscula son idénticos a la secuencia del RBS. Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio. Codón de inicio (*Start codon*): nucleótidos en letra mayúscula y en negrita. ^e Función putativa. ^f Proteína que evidenció mayor identidad con la secuencia dada.

Tabla 7. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago *Leuconostoc* Ln-8 y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start	Stop	Size ^a (aa)	MM ^b (kDa)	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d (5'-TAGGAGGT-3')	Predicted function ^e	Best match (% amino acid identity) ^f
1	588	286	100	11,6	8,3	TAGGAGGTtgaag ATG	phage HNH endonuclease	ORF1 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
2	777	601	58	6,9	9,4	AAGGATAAttaat ATG	hypothetical protein	ORF2 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
3	1216	779	145	16,7	6,9	GAAGAGGTatcaaaaa ATG	phage-related protein	ORF3 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (99 %)
4	1359	1213	48	5,9	12,0	AAGGAGCAaaaaagaa ATG	hypothetical protein	ORF4 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
5	1730	1356	124	14,9	7,8	CAGGAGGAtaatat ATG	endodeoxyribonuclease	ORF5 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
6	2155	3507	450	52,1	5,3	CAGGAGGAaacgcta ATG	DNA helicase	ORF1 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (98 %)
7	3504	4253	249	28,7	5,6	AAAGGGTTgacga ATG	DNA primase/polymerase	ORF7 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (98 %)
8	4262	6097	611	69,7	6,7	TAGGAGTAatc ATG	DNA polymerase	ORF8 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (96 %)
9	6155	6727	190	21,6	4,9	AAGGAGAAtttat ATG	hypothetical protein	ORF9 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
10	6780	7412	210	24,0	5,6	AGGGAGGAattaaat ATG	hydrolase	ORF10 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (99 %)
11	7424	7750	108	12,5	5,2	TAGGAGGTaatat ATG	terminase small subunit	ORF11 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (96 %)
12	7761	7958	65	7,8	9,2	TAGGAGGTttat ATG	hypothetical protein	ORF12 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
13	8023	8181	52	5,9	10,1	AAAATCATtcccagt ATG	terminase small subunit	ORF9 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (88 %)
14	8165	9811	548	63,0	5,1	AAGGAGGGtaatag ATG	terminase large subunit	ORF13 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
15	9824	10945	373	43,0	4,9	AAGGAGAAaactat ATG	portal protein	ORF14 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (99 %)
16	10905	11630	241	26,2	4,3	CAGGAGACtactacga ATG	phage prohead protease	ORF14 (<i>Leuc.</i> phage Φ LNTR2) (90 %)
17	11682	12635	317	34,7	5,2	AAGGAGACtataat ATG	major capsid protein	ORF15 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN34) (99 %)
18	12785	13057	90	10,4	4,3	TAGGAGGTgacaca ATG	hypothetical protein	ORF17 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (94 %)
19	13047	13325	92	10,6	10,1	GAGGAGGCgattagat ATG	phage tail protein	ORF18 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (100 %)
20	13325	13642	105	12,3	4,6	GGGAGGTAatcattta ATG	hypothetical protein	ORF19 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (98 %)
21	13639	13968	109	12,4	10,9	AGACAGGTgttaatatt ATG	hypothetical protein	ORF20 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (98 %)
22	14017	14598	193	21,3	4,8	AAGGAGAAttaatcaatt ATG	major tail protein	ORF21 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (98 %)
23	14672	17239	855	86,7	7,7	AAGGAAATgtattat ATG	tail tape measure protein	ORF22 (<i>Leuc.</i> phage Φ LN25) (98 %)

24	17303	18499	398	45,5	4,7	ATGGAGGAaattat ATG	hypothetical protein	ORF22 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNTR2) (94 %)
25	18502	19500	332	36,9	4,8	TAGGAGATtaatc ATG	structural protein	ORF24 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (99 %)
26	19655	19515	46	5,4	9,8	AAGGTGGTtctaaactatagt GTG	hypothetical protein	ORF21 (<i>Leuc. phage</i> Lmd1) (53 %)
27	20109	19708	133	15,8	4,8	AAGGAGAAtaaagac ATG	hypothetical protein	ORF25 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (98 %)
28	20190	20954	254	27,9	7,8	GAGGAGATctaaaa ATG	receptor-binding protein	ORF26 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (99 %)
29	21357	20986	123	14,0	6,4	AAGGAGACccacatt ATG	holin_I	ORF27 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
30	22161	21424	245	28,9	4,9	AAGGAGATggggtt ATG	hypothetical methyltransferase	ORF28 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (98 %)
31	22322	22158	54	6,4	8,1	TGGGAGAGaagta ATG	hypothetical protein	ORF29 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
32	22591	22322	89	10,2	9,0	AAGGAGAAaaca ATG	putative gag-pol polyprotein	ORF30 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
33	22827	22588	79	9,3	9,5	ATTGAGGTattata ATG	hypothetical protein	ORF31 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
34	23063	22827	78	9,1	6,8	AAGGGAAAcatt ATG	hypothetical protein	ORF32 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
35	23268	23053	71	8,9	7,9	AGAGAGGTtccaagta ATG	hypothetical protein	ORF33 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
36	23519	23268	83	8,7	9,8	AAGGAGAAaaca ATG	phage-related hydrogenase	ORF34 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
37	23764	23594	56	6,0	8,6	AAAGAGGAacaac GTG	hypothetical protein	ORF33 (<i>Leuc. phage</i> 1-A4) (95 %)
38	24767	23886	293	31,5	6,2	AAGGAGGAaagta ATG	lysin	ORF36 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (100 %)
39	25116	24769	115	12,6	9,3	ATGGAGGAcacatt ATG	holin_II	ORF34 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN34) (91 %)
40	27136	25142	664	72,6	5,5	TAGGAGGAttattat ATG	neck passage structure protein	ORF38 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (93 %)
41	27563	27246	105	12,0	5,6	AAGGAGATataaa ATG	hypothetical protein	ORF39 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (98 %)
42	27762	27565	65	7,8	4,6	TATGTGGTaaatgtg ATG	hypothetical protein	ORF38 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN34) (91 %)
43	28055	27768	95	11,3	6,3	GAGGAAGTgagcaa ATG	hypothetical protein	ORF41 (<i>Leuc. phage</i> 1-A4) (57 %)
44	28303	28052	83	9,9	4,2	AGGGAGATaaca ATG	hypothetical protein	ORF40 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (98 %)
45	28619	28449	56	6,4	6,2	AAGGAAATaatatgac ATG	repressor	ORF41 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN25) (96 %)

^a Número de aminoácidos de la proteína. ^b Tamaño de la proteína (kDa). ^c Punto isoelectrico de la proteína (pI). ^d RBS: *Ribosome Binding Site*. Nucleótidos en letra mayúscula son idénticos a la secuencia del RBS. Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio. Codón de inicio (*Start codon*): nucleótidos en letra mayúscula y en negrita. ^e Función putativa. ^f Proteína que evidenció mayor identidad con la secuencia dada.

Tabla 8. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago *Leuconostoc* Ln-9 y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start	Stop	Size ^a (aa)	MM ^b (kDa)	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d (5'-TAGGAGGT-3')	Predicted function ^e	Best match (% amino acid identity) ^f
1	982	680	100	11,6	8,3	AGGAGGTttaaagATG	phage HNH endonuclease	ORF1 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (99 %)
2	1171	995	58	6,9	9,4	GATAAGGAtaataatATG	hypothetical protein	ORF2 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (93 %)
3	1610	1173	145	16,7	6,2	AAGGAGCAaagaagaaATG	phage-related protein	ORF2 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (94 %)
4	1981	1607	124	14,9	7,8	CAGGAGGAtaatatATG	Endodeoxyribonuclease	ORF5 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (100 %)
5	2408	3760	450	52,1	5,2	CAGGAGGAaacaattATG	DNA helicase	ORF1 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (99 %)
6	3757	4512	251	29,0	6,0	AAGGATTGacgaATG	DNA primase/polymerase	ORF3 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (96 %)
7	4588	5145	185	21,2	5,4	TAGGAGAAAAaacATG	DNA polymerase	ORF4 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (84 %)
8	5142	6977	611	69,5	8,0	AATAAGGCaaaaccaatcATG	DNA polymerase	ORF8 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (96 %)
9	7035	7607	190	21,6	4,9	AAGGAGAAtttatATG	hypothetical protein	ORF9 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (99 %)
10	7660	8292	210	24,0	5,6	AGGGAGGAattaaaacATG	hydrolase	ORF7 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (99 %)
11	8303	8629	108	12,4	5,2	TAGGAGGTaatatATG	terminase small subunit	ORF11 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR2) (98 %)
12	8691	8849	52	5,8	10,6	AAAATCATtccccagtATG	terminase small subunit	ORF9 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (92 %)
13	8833	10479	548	62,9	5,0	GAGGAGGGcaatagATG	terminase large subunit	ORF10 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (99 %)
14	10492	11613	373	43,0	4,9	AAGGAGAAactatATG	portal protein	ORF11 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (98 %)
15	11573	12298	241	26,2	4,3	CAGGAGACtactcgaATG	phage prohead protease	ORF15 (<i>Leuc.</i> phage ΦLNTR2) (90 %)
16	12350	13303	317	34,7	5,2	AAGGAGACctataatATG	major capsid protein	ORF17 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN34) (99 %)
17	13379	13651	90	10,4	4,2	TAGGAGGTgacacaATG	hypothetical protein	ORF17 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (96 %)
18	13641	13919	92	10,6	10,1	GAGGAGGCgatcagatATG	phage tail protein	ORF15 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (100 %)
19	13919	14236	105	12,3	4,5	GGGAGGTAatcatttaATG	hypothetical protein	ORF19 (<i>Leuc.</i> phage ΦLN25) (98 %)
20	14233	14562	109	12,3	10,9	AGGCAGGTgtaattattATG	hypothetical protein	ORF17 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (98 %)
21	14611	15186	191	21,1	4,8	AAGGAGAAtaatacaattATG	major tail protein	ORF18 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (93 %)
22	15313	17982	889	90,9	8,6	AAGGAAATgtattatATG	tail tape measure protein	ORF19 (<i>Leuc.</i> phage 1-A4) (95 %)
23	17995	18129	44	5,1	9,0	AATAAGGAgacgatATG	-	

24	18176	19372	398	45,2	4,7	ATGGAGGAatttac ATG	hypothetical protein	ORF20 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (68 %)
25	19375	20373	332	37,2	4,8	TAGGAGATaaaa ATG	base plate	ORF21 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (71 %)
26	20606	20388	72	8,3	9,7	AAAGAGGTaa TTG	hypothetical protein	ORF21 (<i>Leuc. phage Lmd1</i>) (56 %)
27	20982	20581	133	15,7	4,8	AAGGAGAAtaaagac ATG	hypothetical protein	ORF22 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (96 %)
28	21832	21062	256	28,6	5,0	GAGGAGATttaa ATG	receptor-binding protein	ORF23 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (56 %)
29	22239	21868	123	14,0	6,4	AAGGAGACcccacatt ATG	holin_I	ORF27 (<i>Leuc. phage ΦLN25</i>) (97 %)
30	22477	22310	55	6,9	10,8	AAGGAGATggattt ATG	-	
31	22638	22474	54	6,4	4,8	TTGGAGAGaagta ATG	hypothetical protein	ORF27 (<i>Leuc. phage ΦLNTR2</i>)(89 %)
32	22868	22638	76	9,0	9,3	TTGGAGCGtaatc ATG	hypothetical protein	ORF27 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (96 %)
33	23106	22861	81	9,6	9,7	ATTGAGGTtctatg ATG	-	
34	23342	23106	78	9,1	6,0	AAGGAACGagaaa ATG	hypothetical protein	ORF28 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (92 %)
35	23463	23332	43	5,4	4,8	AAGGAAAaccgtt ATG	-	
36	23668	23450	72	9,2	7,9	AGAGAGGTtcgcaagta ATG	hypothetical protein	ORF29 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (85 %)
37	24168	23668	166	18,8	9,4	AAGGAGAAaacia ATG	phage-related hydrogenase	ORF31 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (96 %)
38	24414	24244	56	6,1	8,4	AAGGAGAAaaa ATG	hypothetical protein	ORF33 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (95 %)
39	25409	24528	293	31,6	6,0	AAGGAGGAaaaataac ATG	phage-related amidase	ORF36 (<i>Leuc. phage ΦLN25</i>) (98 %)
40	25758	25411	115	12,6	9,3	GATGAGGTaacia ATG	holin_II	ORF36 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (96 %)
41	26023	25751	90	9,8	4,0	TAGGAGATAaatt ATG	hypothetical protein	ORF37 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (90 %)
42	26756	26034	240	26,0	7,8	TAGGAGGAattaattttt ATG	baseplate protein	ORF38 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (37 %)
43	27140	26823	105	11,9	9,1	AGGGAGGAgttctaac ATG	hypothetical protein	ORF39 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (94 %)
44	27285	27142	47	5,6	4,4	AAGGAGATataat ATG	-	
45	27484	27287	65	7,6	4,7	AGTTTGGTaaatgtg ATG	hypothetical protein	ORF41 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (91 %)
46	27765	27490	91	10,7	4,6	AAGGAAGTgagcaa ATG	hypothetical protein	ORF42 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (87 %)
47	28013	27762	83	9,8	4,2	AGGGAGAAtaacia ATG	hypothetical protein	ORF43 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (66 %)
48	28341	28162	59	6,8	6,2	ATTGTTGTta ATG	repressor	ORF45 (<i>Leuc. phage 1-A4</i>) (93 %)

^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 letra mayúscula son idénticos a la secuencia del RBS. Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio. Codón de inicio (*Start codon*): nucleótidos en letra mayúscula y en negrita. ^e Función putativa. ^f Proteína que evidenció mayor identidad con la secuencia dada.

Tabla 9. Open Reading Frames (ORFs) deducidos para el genoma del fago de *Leuconostoc* LDG y sus respectivas funciones putativas.

ORF	Start	Stop	Size ^a (aa)	MM ^b (kDa)	pI ^c	Putative RBS and start codon ^d (5'-TAGGAGGT-3')	Predicted function ^e	Best match (% amino acid identity) ^f
1	746	435	104	12,4	9,0	none	phage HNH endonuclease	ORF1 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO3) (97 %)
2	1140	718	141	15,2	9,4	none	endodeoxyribonuclease	ORF2 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO3) (93 %)
3	1723	3117	465	52,8	5,4	AGGAGGcctacaacATG	DNA helicase	ORF4 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (100 %)
4	3107	3877	257	30,0	5,8	GGGGGTgctttttATG	DNA primase/polymerase	ORF4 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (95 %)
5	3937	5754	606	68,5	5,8	AGGAGGacagaaaATG	DNA polymerase	ORF5 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO3) (97 %)
6	5812	6369	186	21,1	8,9	AGGAAGTgtaacaATG	hypothetical protein	ORF6 (<i>Leuc. phage</i> ΦLmd1)(100 %)
7	6439	7062	208	24,3	6,5	AAGAGAagataatcATG	hydrolase	ORF7 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO3) (99 %)
8	7081	7431	117	13,5	5,1	TTGAGGtaataaccaatATG	terminase small subunit	ORF6 (<i>Leuc. phage</i> ΦLmd1) (100 %)
9	7434	9074	547	63,1	5,5	CGGAGAattgagATG	terminase large subunit	ORF12 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN6B) (99 %)
10	9065	10306	414	46,5	5,3	none	portal protein	ORF12 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (99 %)
11	10257	10982	242	26,1	4,8	AGGGAGcacggctaATG	phage prohead protease	ORF13 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (98 %)
12	11040	12008	323	34,7	6,1	GTGAGGaaaatattataATG	major capsid protein	ORF13 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN12) (99 %)
13	12083	12361	93	11,1	4,6	AGGAAAaccgactattATG	hypothetical protein	ORF14 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN03) (92 %)
14	12358	12639	94	10,59	10,0	AGGTGGtggaagaATG	phage tail protein	ORF15 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN6B) (100 %)
15	12639	12950	104	11,84	5,3	GGGTGGtaatcgctaATG	hypothetical protein	ORF13 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN12) (100 %)
16	12950	13306	119	13,6	11,0	ATGTGGtggttctctAATG	hypothetical protein	ORF16 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (97 %)
17	13357	13941	195	21,6	5,2	GTGAGGataataaaaacATG	major tail protein	ORF17 (<i>Leuc. phage</i> ΦLmd1) (96 %)
18	14091	15935	615	63,1	9,6	AGGAGCttttaaATG	tail tape measure protein	ORF18 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN04) (99 %)
19	15913	16674	254	25,6	11,0	TGGTCAattgATG	tail tape measure protein	ORF18 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (98 %)
20	16716	17831	372	41,8	5,0	ATGTGAtataatcgtagATG	hypothetical protein	ORF20 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (92 %)
21	17834	18703	290	32,4	5,4	TGGAGActagagATG	structural protein	ORF21 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (98 %)
22	18717	19697	327	34,8	7,9	AGAAAGGtaataacATG	receptor-binding protein	ORF22 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (73 %)
23	19968	19717	84	09,5	9,5	AGGATAatagccttctCATG	hypothetical protein	ORF23 (<i>Leuc. phage</i> ΦLmd1) (93 %)

24	20323	19943	127	14,7	4,9	AGGACGaaccaac ATG	hypothetical protein	ORF24 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (100 %)
25	20771	20388	128	14,3	6,6	CGAATGGAaacataata ATG	holin	ORF25 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN12) (99 %)
26	21040	20852	63	14,6	4,5	CGGAGAtaaaaatc ATG	hypothetical protein	ORF26 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (98 %)
27	21485	21033	151	16,3	4,6	TGGTGAaaggataaaac ATG	lysin	ORF28 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (83 %)
28	22433	21489	315	06,8	5,7	none	phage-related methyltransferase	ORF28 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN12) (85 %)
29	22708	22433	92	10,8	9,6	AAAAGGaaaataacta ATG	hypothetical protein	ORF27 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (96 %)
30	22977	22708	90	10,2	7,8	AGGAGCcagatag ATG	hypothetical protein	ORF30 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (98 %)
31	23192	22974	73	08,2	5,3	AGGAGAtaacacatt G TG	hypothetical protein	ORF31 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (97 %)
32	23493	23245	83	09,8	4,8	TGGAGTgagtg ATG	hypothetical protein	ORF30 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN03) (95 %)
33	23702	23493	70	08,3	9,6	AGAGGatttcaaaaa ATG	transcriptional regulator	ORF32 (<i>Leuc. phage</i> ΦP793) (99 %)
34	23845	23699	49	06,2	12,0	AAGGGGtaaattggt ATG	hypothetical protein	ORF32 (<i>Leuc. phage</i> ΦLmd1) (94 %)
35	24111	23842	90	10,8	10,0	AGGAGCaattata ATG	response regulator	ORF34 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN12) (93 %)
36	24627	24274	118	13,3	4,6	AGGAGCaattata ATG	hypothetical protein	<i>Lactobacillus mali</i> (37 %)
37	24878	24627	84	09,9	9,6	AGGAGGtcacaaaag ATG	hypothetical protein	ORF36 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (98 %)
38	25769	24987	261	29,4	11,0	AGGAGGtaatt ATG	lysin	ORF38 (<i>Leuc. phage</i> ΦLN12) (92 %)
39	26217	25780	146	15,6	9,1	AAGAGGattaacat ATG	holin	ORF38 (<i>Leuc. phage</i> ΦLNO4) (92 %)
40	26367	26221	49	05,7	7,2	AGGAACGataagact ATG	repressor	ORF40 (<i>Leuc. phage</i> ΦLmd1) (100 %)

^a Número de aminoácidos de la proteína. ^b Tamaño de la proteína (kDa). ^c Punto isoelectrico de la proteína (pI). ^d RBS: *Ribosome Binding Site*. Nucleótidos en letra mayúscula son idénticos a la secuencia del RBS. Nucleótidos en letra minúscula son aquellos que se encuentran entre el RBS y el codón de inicio. Codón de inicio (*Start codon*): nucleótidos en letra mayúscula y en negrita. ^e Función putativa. ^f Proteína que evidenció mayor identidad con la secuencia dada.

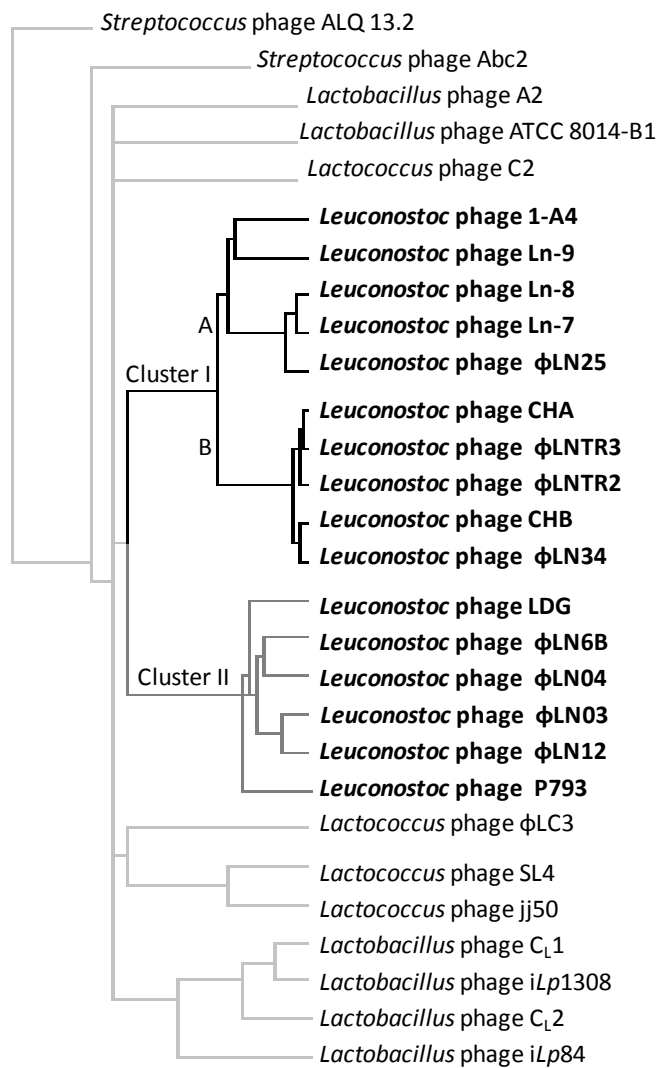


Figura 16. Árbol filogenético obtenido a partir de los genomas de 28 fagos que infectan diversas especies de bacterias lácticas (Gegenees versión 2.2.1). Los fagos marcados en negrita (incluidos aquellos estudiados en la presente Tesis) pertenecen al género *Leuconostoc*.

Fagos del Grupo 1: análisis genómico

La representación esquemática de la comparación genómica de los fagos de *Leuconostoc* secuenciados en esta Tesis, se muestra en la Figura 15. Los fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 presentaron elevada identidad con los fagos que infectan cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, no solamente en su secuencia nucleotídica sino también en el ordenamiento de los genes, en el tamaño y en el punto isoeléctrico de algunas proteínas estructurales con la misma función. Los ORFs deducidos del genoma de los fagos estudiados, así como también sus funciones proteicas putativas se detallan en las Tablas 4 a 8.

- **Genes involucrados en la replicación del ADN**

Dentro del módulo de replicación en los fagos de *Leuconostoc* secuenciados pertenecientes al **Grupo 1**, se encontraron al menos 4 ORFs con funciones conocidas e involucrados en la replicación del ADN (ADN helicasa, ADN primasa/polimerasa, ADN polimerasa, hidrolasa) y una proteína hipotética. Los ORFs que codificarían para la helicasa son los que presentaron mayor diversidad genética, con una identidad inferior al 60 % entre los 5 fagos de este grupo (Tablas 4 a 8). Por su parte, la presencia de genes que codificarían para la polimerasa, sugiere que los fagos serían capaces de producir esta enzima, en lugar de reprogramar la enzima de la cepa hospedadora.

Analizando el genoma del fago CHB, se observó que la hidrolasa podría estar codificada por dos ORFs, el ORF10 y el ORF11. La secuencia nucleotídica formada por la fusión de dichos ORFs daría lugar a una secuencia idéntica ($\geq 90\%$) al gen codificante para la hidrolasa en el fago CHA (ORF9) (Figura 15).

Por otro lado, el ORF9 deducido para el fago CHB, evidenció un 39 % de identidad con la endonucleasa del fago de *Lactococcus* Φ 43 (ORF 40) (Murphy y col., 2016). Por la ubicación en el genoma del fago CHB, al igual que para el fago Φ 43, esta proteína podría estar vinculada a la etapa de síntesis y replicación del ADN (Murphy y col., 2016).

- **Genes involucrados en el empaquetamiento del ADN**

Para los cinco fagos del **Grupo 1**, el módulo de empaquetamiento estaría formado por genes que codifican para las subunidades menor y mayor de la terminasa. En los fagos que poseen cola, la subunidad menor es responsable de la unión del ADN, mientras que la

subunidad mayor interviene en el clivaje del ADN fágico (Lu y col., 2005). La presencia de dichos genes pudo evidenciarse al analizar el genoma de los fagos secuenciados del **Grupo 1**, ya que en la mayoría se observaron dos ORFs que codificarían para la subunidad menor de la terminasa y un ORF que codificaría para la subunidad mayor de la terminasa. Esto mismo fue observado en el fago 1A-4 (Lu y col., 2010). Por el contrario, el fago CHB exhibió dos ORFs (ORF13 y ORF14) que codificarían para la subunidad menor de la terminasa y otros dos que codificarían para la subunidad mayor de la terminasa (ORF15 y ORF16).

- ***Genes involucrados en la morfogénesis de la cápside y la cola***

Los cinco fagos de este **Grupo** presentaron el módulo de empaquetamiento cercano al módulo de morfogénesis. Este último módulo estaría formado por genes estructurales codificantes para proteínas de la cápside (proteína portal, proteasa de la procápside, proteína mayor de la cápside) y proteínas de la cola (proteína de la cola, proteína mayor de la cola, proteína *tail tape measure*, proteína estructural, proteína de la placa basal y proteína de unión al receptor). Los ORFs que codificarían para proteínas de la cápside y de la cola se agrupan en *clusters*, ubicándose primero los de la cabeza y luego los de la cola (Figura 15).

La longitud de la cola de los fagos está determinada por la proteína *tail tape measure*, que actúa como una proteína de andamiaje durante la polimerización del tubo de la cola (Katsura, 1990). En el caso del fago Ln-7, esta proteína estaría codificada por dos ORFs, el ORF23 y el ORF24, lo que marca una diferencia con el resto de los fagos (CHA, CHB y Ln-8), en los cuales dicha proteína estaría codificada en un solo ORF. En el fago Ln-8, el ORF23, que codificaría para la *tail tape measure*, tiene una identidad mayor al 99 % al obtenido por la fusión de los ORF23 y ORF24 del fago Ln-7. A pesar de dicha identidad, la codificación de la proteína por dos ORFs en el fago Ln-7 y por un solo ORF en el fago Ln-8, podría dar como resultado fagos de distintos tamaños.

La proteína *tail tape measure* presenta a menudo un número variable de repeticiones en tándem con una cantidad conservada de moléculas de fenilalanina y triptofano ubicadas en posiciones fijas. Dichos aminoácidos son utilizados como sitio de anclaje por parte de proteínas auxiliares menores. El espaciamiento regular entre estos anclajes es una característica estructural clave (Belcaid y col., 2011). Teniendo en cuenta la cantidad y el espaciamiento de los aminoácidos fenilalanina y triptofano en los ORFs que codifican para la proteína *tail tape measure*, se puede observar que los fagos de *Leuconostoc* secuenciados

tienen una cantidad de moléculas de fenilalanina (44 aminoácidos) y triptofano (5 aminoácidos) conservada, a pesar de no presentar repeticiones en tándem.

Por otro lado, los cinco fagos del **Grupo 1**, presentaron un ORF que codificaría para la proteína de unión al receptor (RBP). El proceso de infección comienza con la adsorción de los fagos a las células hospedadoras. Esta interacción específica se produce entre la proteína RBP del fago y el receptor ubicado en la superficie celular bacteriana (Kot y col., 2013). El gen que codifica para la RBP contiene una región conservada y otra variable, esta última situada en el extremo C-terminal. La región variable de la RBP es la responsable de la especificidad de unión del fago al hospedador (Duplessis y Moineau, 2001).

En este trabajo se realizó un análisis comparativo de las RBPs deducidas de los genomas de los 6 fagos secuenciados, incluyendo las RBP de otros fagos de *Leuconostoc* previamente reportados (Lu y col., 2010; Kot y col., 2014). Por otro lado, se realizó una segunda comparación entre las distintas regiones variables, que permitió clasificarlas en cinco **Grupos (A, B, C, D y E)** con respecto a su identidad aminoacídica (Figura 17B).

Las RBPs de los fagos del **Grupo 1** presentaron una región conservada en el extremo N-terminal con una identidad mayor al 80 %, y una región variable ubicada en el extremo C-terminal (Figura 17A).

Las fracciones variables deducidas de los ORF27 y ORF29 de los fagos CHA y CHB, respectivamente (Grupo A), revelaron una identidad mayor al 99 % entre ellos; mientras que aquellas deducidas de los ORF29 y ORF28 de los fagos Ln-7 y Ln-8, respectivamente (Grupo B), presentaron una identidad del 100 %. El fago Ln-9 (Grupo C) presentó la menor identidad en la región variable, deducida a partir del ORF28.

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 hospedadora (Frank y Hassan, 1998; Ackermann, 2009). Los fagos Ln-7 y Ln-9, presentaron un ORF (ORF42) que codificaría para la proteína de la placa basal. Dichos ORFs revelaron una identidad del 56 % y 37 %, respectivamente, con el ORF38 que codifica para la placa basal del fago 1-A4 (Lu y col., 2010). En el fago Ln-9 se detectó un ORF adicional (ORF25) también codificante para la proteína de la placa basal, con una identidad del 71 % con el ORF21 del fago 1-A4 (Lu y col., 2010).

El ORF40 deducido a partir del genoma del fago Ln-8, codificaría para la proteína *neck passage structural* (NPS). Este tipo de proteínas fue encontrado principalmente en fagos de *Lactococcus*, donde cumplen una función estructural.

- **Genes involucrados en el módulo de lisis**

Dentro del módulo de lisis de cada uno de los fagos de *Leuconostoc* secuenciados pertenecientes al **Grupo 1**, se detectó un gen codificante para una lisina (Figura 15). Para los fagos Ln-7 y Ln-8, los ORF39 y ORF38 que codificarían, respectivamente, para la lisina, presentaron 100 % de identidad con la lisina del fago Φ LN25 (Kot y col., 2014). En el caso de los fagos CHA y CHB, los ORF35 y ORF37 que codificarían, respectivamente, para la lisina, exhibieron una identidad del 100 % con los ORFs que codifican para la lisina en los fagos Φ LNTR3 y Φ LN34, respectivamente (Kot y col., 2014).

Los ORF31 y ORF30 deducidos para los fagos Ln-7 y Ln-8, respectivamente, podrían codificar para una metiltransferasa. Dichos genes tienen una alta identidad con la metiltransferasa perteneciente al sistema de Restricción-Modificación (R/M) del Tipo 1 encontrado en la cepa *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 (Makarova y col., 2006). Se ha descrito que algunos fagos son capaces de producir ADN metiltransferasas que actúan protegiendo a las partículas virales de los sistemas R/M que pudieran estar presentes en las bacterias (Labrie y col., 2010).

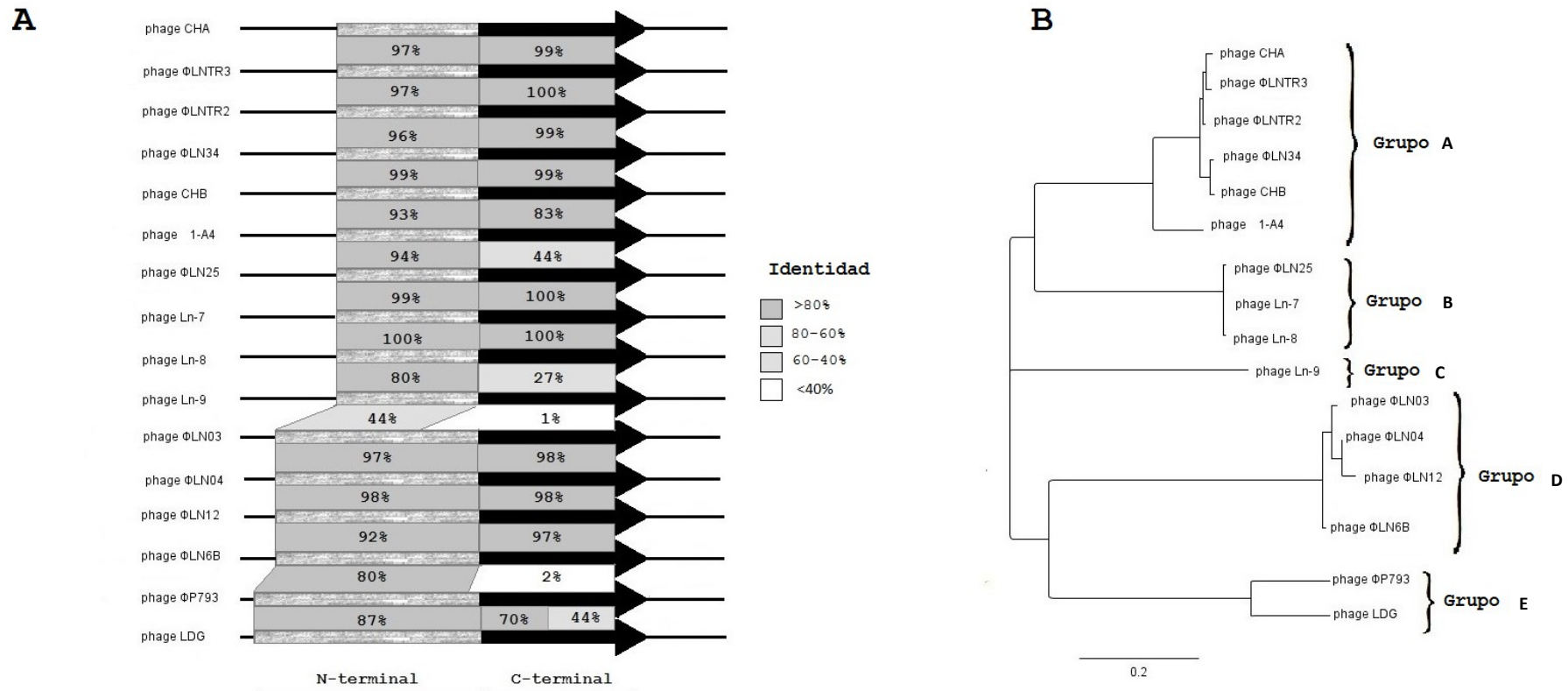


Figura 17. Análisis comparativo de las secuencias RBP (*receptor binding protein*) de fagos de *Leuconostoc*. A) Similitud aminoacídica de 16 fagos de *Leuconostoc* calculada usando el algoritmo Blastp. Las flechas se dividen en dos fragmentos: el primero corresponde a la región conservada (N-terminal) y el segundo fragmento corresponde a la región variable (C-terminal) de la proteína. B) Dendrograma obtenido por comparación de la región variable (C-terminal) de las RBPs de 16 fagos de *Leuconostoc*, incluyendo los 6 fagos secuenciados en este estudio. La distancia de la matriz y la visualización se obtuvieron mediante Geneious 9.0.2.

Fagos del Grupo 2: análisis genómico

El fago LDG presentó elevada identidad con los fagos que infectan cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, no solamente en su secuencia nucleotídica sino también en el ordenamiento de los genes, en el tamaño y en el punto isoeléctrico de algunas proteínas estructurales con la misma función. En contraste, se evidenció muy baja identidad con los fagos que infectan cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, considerándose al fago LDG un fago específico de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, a pesar de su capacidad para infectar ambas especies. Los ORFs deducidos del genoma, así como también sus funciones proteicas putativas se detallan en la Tabla 9.

- **Genes involucrados en la replicación del ADN**

Dentro del módulo de replicación se identificaron 4 ORFs involucrados en esta función. El ORF3 mostró identidad con una helicasa (*NTP-binding*) perteneciente al fago Φ LN04, específico de *Leuconostoc pseudomesenteroides* (Kot y col., 2014). Cercano a este gen, se encontraron los ORF4 y ORF5, que codificarían para proteínas similares a las ADN polimerasas de los fagos P793 y Φ LN03 (Kot y col., 2014), respectivamente. Como se mencionara para los fagos del **Grupo 1**, la presencia de estos genes en el genoma del fago LDG sugiere que el mismo sería capaz de producir esta enzima, en lugar de reprogramar la enzima de la cepa hospedadora. Finalmente, el ORF7 presentó un 99 % de identidad con la hidrolasa del fago Φ LN03. Estos genes participarían en la síntesis de ADN fágico.

- **Genes involucrados en el empaquetamiento del ADN fágico**

Los ORFs 8 y 9 evidenciaron elevada identidad con los genes que codifican para las subunidades menor y mayor de la terminasa encontrados en los fagos Lmd1 y Φ LN6B, respectivamente, ambos líticos de *Leuc. pseudomesenteroides* (Kot y col., 2014). A diferencia de lo observado en los fagos secuenciados del **Grupo 1**, el fago LDG presentó un solo ORF que codifica para la subunidad menor de la terminasa (Figura 15).

- **Genes involucrados en la morfogénesis de la cápside y la cola**

El módulo de empaquetamiento del genoma fágico está conformado por genes que codificarían para proteínas de la cápside (proteína portal, proteasa de la procápside,

proteína mayor de la cápside) y proteínas de la cola (proteína de la cola, proteína mayor de la cola, proteína *tail tape measure*, proteína estructural y proteína de unión al receptor).

El ORF22 codificaría para la proteína RBP, formada por una región conservada (extremo N-terminal) y otra variable (extremo C-terminal) (Figura 17A). En el análisis comparativo de las regiones variables de las RBPs (extremo C-terminal) (Figura 17B), el fago LDG se agrupó junto al fago P793 (Kot y col., 2014), infectivo de cepas de *Leuc. pseudomesenteroides*. Dentro de la región comparada, dichos fagos presentaron un fragmento similar (70 % de identidad) y otro más variable (44 % de identidad) (Figura 17).

- **Genes involucrados en la lisis del hospedador**

El módulo de lisis del fago LDG reveló la presencia de cuatro ORFs que codificarían para dos lisinas y dos holinas. La función de lisina fue atribuida al ORF27 por similitud al ORF28 del fago P793 (Kot y col., 2014) y al ORF38, que evidenció similitudes con el ORF38 del fago Φ LN12 (Kot y col., 2014) (Tabla 9). Por otro lado, la función de holina fue atribuida a los ORF25 y ORF39, por identidad con los ORF25 y ORF38 de los fagos Φ LN12 y Φ LN04 (Kot y col., 2014), respectivamente. Dentro del módulo de lisis también se identificó una metiltransferasa (ORF28) con una identidad mayor al 85 % con la metiltransferasa del fago Φ LN12. La ADN metiltransferasa podría ser utilizada en el fago como mecanismo de protección frente al sistema de R/M utilizado por las bacterias.

2.1.3. Identificación de proteínas estructurales

El fago Ln-8 fue seleccionado para la identificación de proteínas estructurales mediante LC-MS/MS y SDS-PAGE. Por medio de LC-MS/MS fue posible determinar 13 proteínas, mientras que por SDS-PAGE se identificaron 6 bandas distintas (Figura 18).

Las proteínas identificadas por medio de LC-MS/MS fueron asociadas a los ORF23, ORF40, ORF15, ORF25, ORF17, ORF28, ORF16, ORF22 y ORF19, correspondientes a proteína *tail tape measure*, proteína estructural del cuello, proteína portal, proteína de placa basal, proteína mayor de la cápside, proteína de unión al receptor, proteasa de la procápside, proteína mayor de la cola y proteína de la cola, respectivamente. Además, se identificaron proteínas asociadas a los ORF24, ORF20, ORF21 y ORF18, cuya función es desconocida (Figura 18).

En el análisis por SDS-PAGE, la banda 1 de peso molecular estimado en 75 kDa, fue asociada al ORF23 cuyo peso molecular calculado fue de 87 kDa. El ORF23 correspondería a la proteína *tail tape measure* ya que evidenció identidad con el ORF22 del fago Φ LN25 (Kot y col., 2014). La diferencia entre el peso molecular estimado mediante SDS-PAGE y el peso molecular calculado (LC-MS/MS) podría deberse a una escisión de la proteína, previa a su incorporación en la partícula fágica. En la banda 2, se identificó el ORF40 (73 kDa), cuya función correspondería a una proteína estructural del cuello. En la banda 3 (45 kDa) se identificó el ORF15, cuyo peso molecular calculado fue de 43 kDa. El ORF15 correspondería a la proteína portal, dada la identidad de secuencia con el ORF14 del fago Φ LN25 (Kot y col., 2014). Las bandas 4 y 5 fueron asociadas con los ORF17 y ORF28, cuyos pesos moleculares calculados mediante LC-MS/MS (35 y 28 kDa) fueron iguales al estimado por SDS-PAGE, y cuyas funciones corresponderían a la proteína mayor de la cápside y a la proteína de unión al receptor, respectivamente. Finalmente, en la banda 6 (26 kDa) se identificó el ORF22, cuya función correspondería a la proteína mayor de la cola (por identidad con el fago Φ LN25).

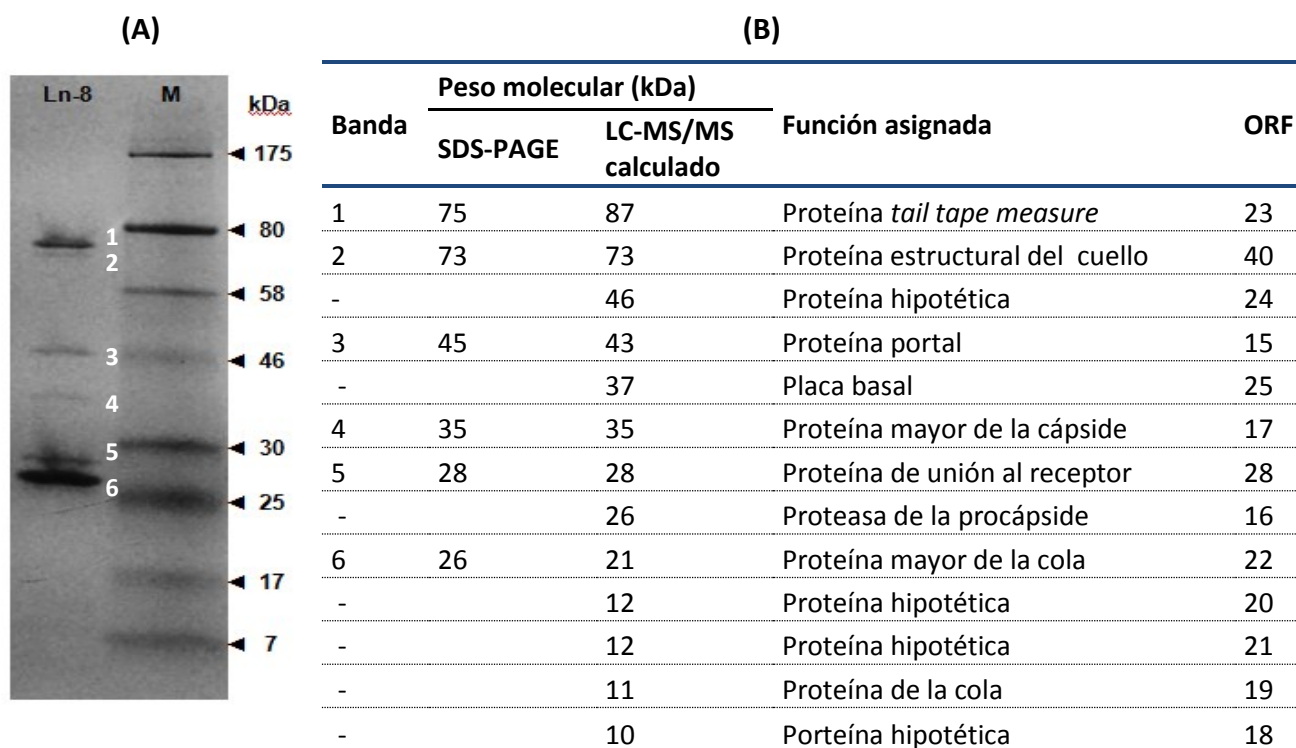


Figura 18. Análisis de proteínas estructurales del fago Ln-8 por SDS-PAGE y LC-MS/MS. (A) Migración de las proteínas del fago Ln-8 en un gel SDS-PAGE (12% m/v) seguido por la tinción con el colorante azul de Coomassie. (B) Identificación y caracterización de las proteínas estructurales del fago Ln-8 analizadas por LC-MS/MS.

2.2. Microscopía electrónica

Todos los fagos en estudio presentaron cápsides icosaédricas de 53 nm de diámetro aproximado, colas no contráctiles, más o menos rígidas, que midieron 143 x 8 nm (longitud x ancho), exhibiendo estrías transversales con una periodicidad de 4 nm y una placa basal de 17 × 10 nm provista de fibras de 15 nm de longitud. De acuerdo a sus características, todos los fagos se incluyeron en la familia *Siphoviridae* (Ackermann y Prangishvili, 2012) (Figura 19).

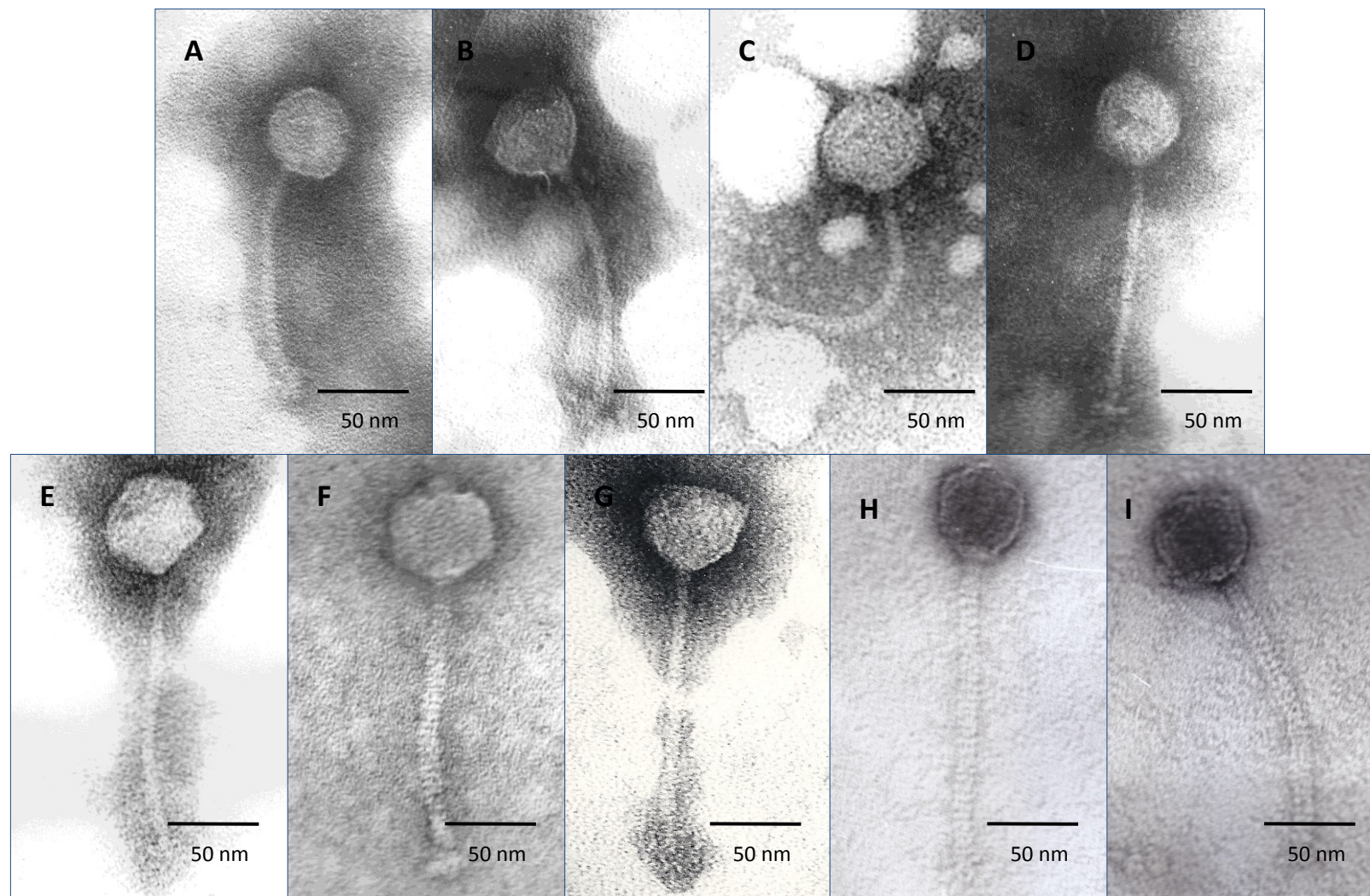


Figura 19. Micrografías electrónicas de los fagos LDG (A), CHA (B), CHB (C), CyC1 (D), CyC2 (E), Ln-6 (F), Ln-7 (G), Ln-8 (H) y Ln-9 (I). Las barras corresponden a 50 nm.

2.3. Viabilidad durante la conservación

La viabilidad de los fagos de *Leuconostoc* en estudio, conservados a diferentes temperaturas (25 °C, 8 °C, -80 °C y -20 °C), se muestra en la Figura 20. Cuando los fagos fueron almacenados a 25 °C, se observó una significativa pérdida de viabilidad, superior a 6 órdenes logarítmicos luego de 10 meses de almacenamiento. Por otro lado, a 8 °C la mayor pérdida de viabilidad correspondió al fago Ln-8, con una disminución de aproximadamente 3,5 órdenes durante el mismo tiempo de estudio. El fago LDG fue una excepción, debido a que reveló una pérdida de viabilidad inferior a los 0,5 órdenes logarítmicos, luego de 10 meses a 8 °C. Por otro lado, no se observó una reducción significativa en el recuento de partículas fágicas durante los diez meses de conservación a -20 °C y -80 °C, para ninguno de los fagos examinados.

De todos los fagos estudiados, el fago LDG fue el más resistente a todas las temperaturas de conservación. Por otro lado, 8 °C fue la temperatura a la cual se observaron mayores diferencias de viabilidad entre fagos.

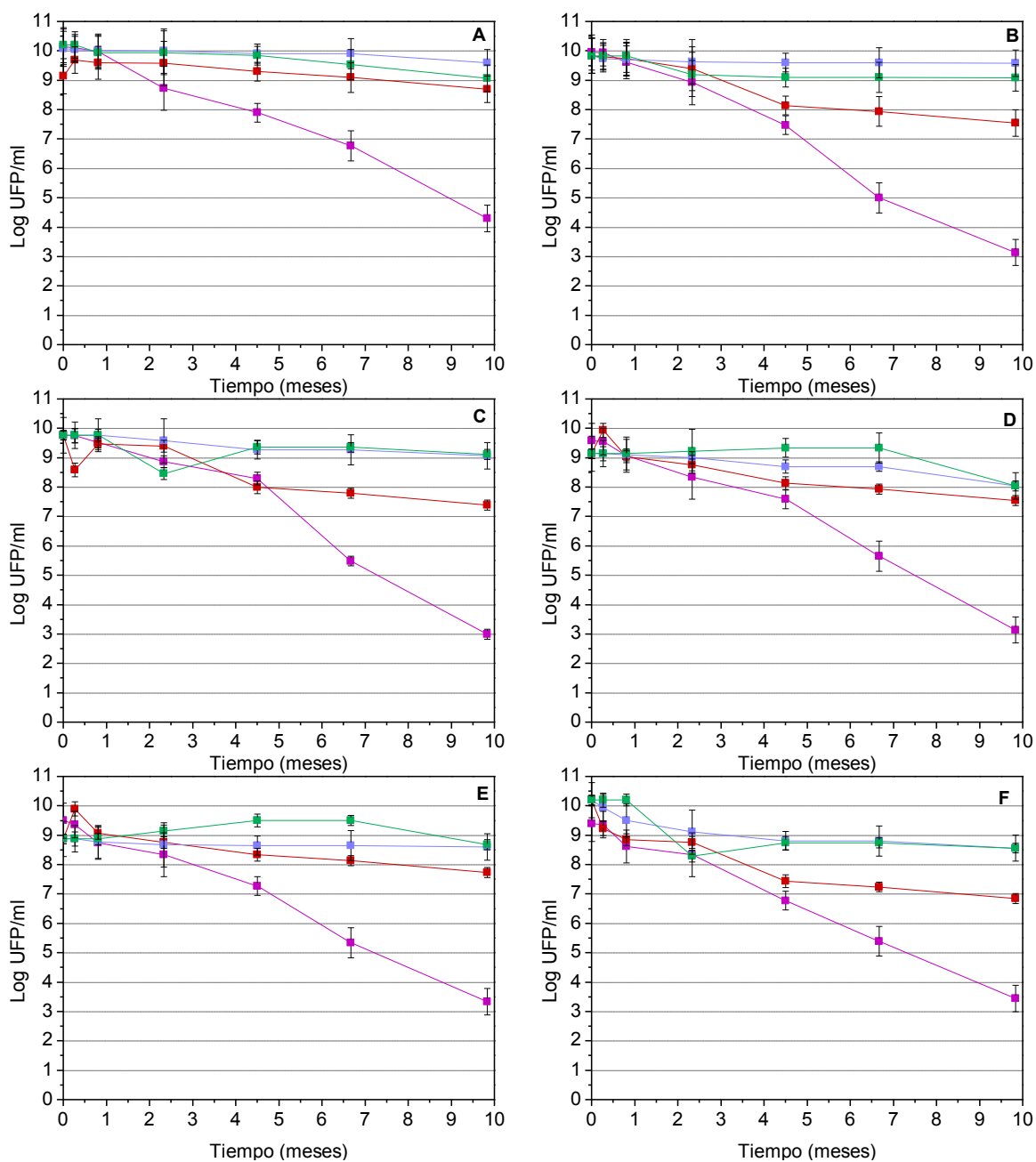


Figura 20. Viabilidad de los fagos LDG (A), CHA (B), CHB (C), CyC1 (D), CyC2 (E) y Ln-6 (F) durante el almacenamiento a 25 °C (■), 8 °C (■), -20 °C (■) y -80 °C (■). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

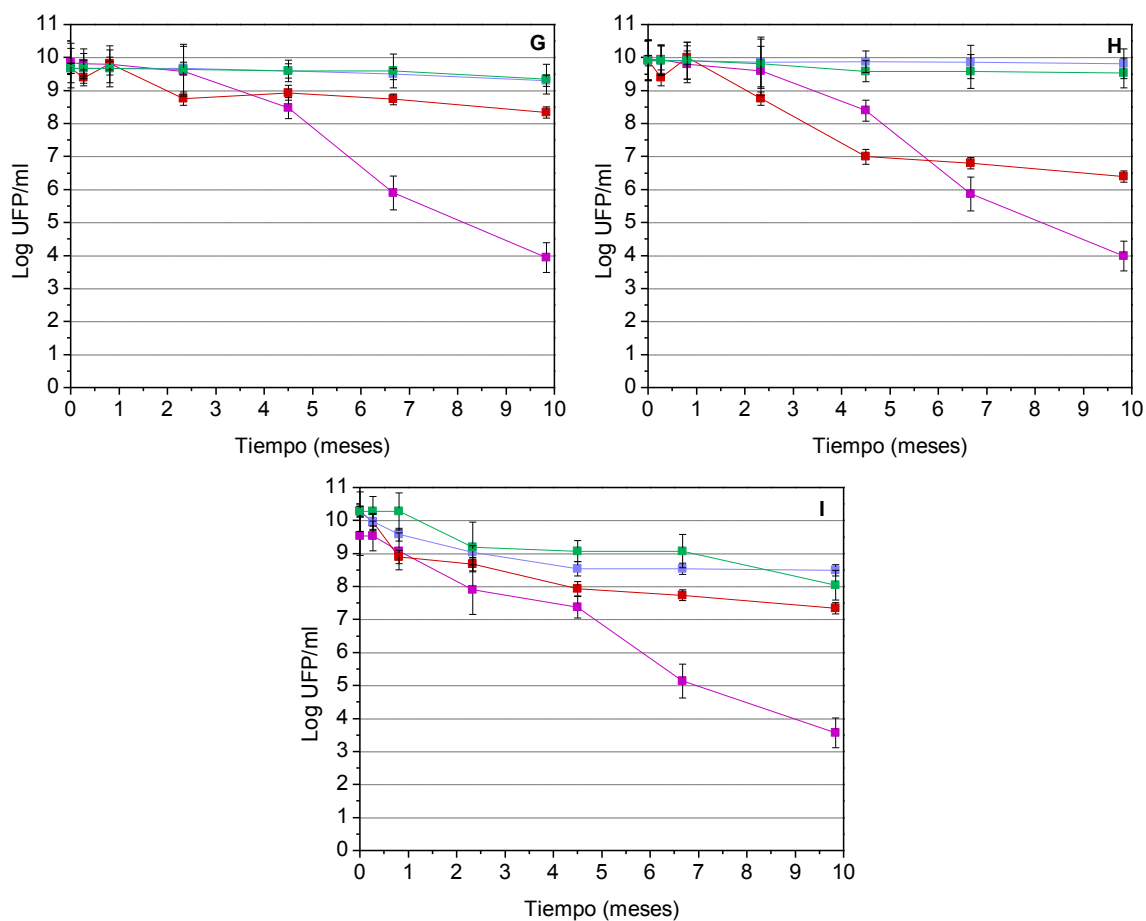


Figura 20 (Continuación). Viabilidad de los fagos Ln-7 (G), Ln-8 (H) y Ln-9 (I) durante el almacenamiento a 25 °C (■), 8 °C (■), -20 °C (■) y -80 °C (■). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2.4. Viabilidad fágica a distintos valores de pH

Los fagos estudiados mostraron alta viabilidad dentro un amplio rango de pH, exhibiendo elevados recuentos aún cuando se incubaron en condiciones extremas de pH. Los mayores valores de infectividad fueron observados entre pH 4 y 11 (Figura 21).

A pH 3, la menor infectividad fágica fue exhibida por los fagos CyC1, Ln-7 y Ln-8. La infectividad de dichos fagos disminuyó más de 6 órdenes, observándose una inactivación completa luego de 30 min; en tanto para los fagos LDG, CHA y CHB solamente decreció 3 órdenes a dicho pH. Todos los fagos en estudio se inactivaron completamente luego de 30 min a pH 2.

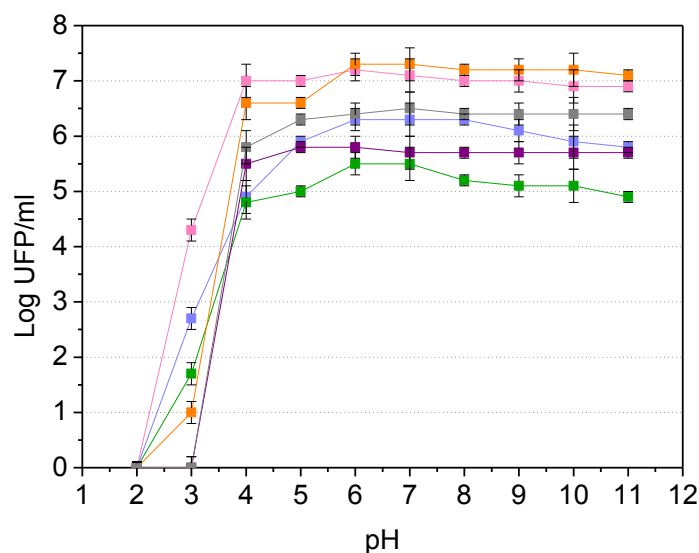


Figura 21. Efecto del pH sobre la viabilidad (luego de 30 min en caldo MRS-Ca) de los fagos LDG (■), CHA (■), CHB (■), CyC1 (■), Ln-7 (■) y Ln-8 (■) a 30 °C. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

2.5. Cinéticas de inactivación térmica

Los seis fagos en estudio mostraron diferente comportamiento frente a los tratamientos a 63 °C y 72 °C, en los tres medios de suspensión ensayados (MRS, *buffer* TMG y LDR) (Figura 22).

Con respecto al tratamiento a 63 °C, una alta resistencia fue exhibida ($T_{99} > 45$ min) para la mayoría de los fagos (LDG, CHA, CHB, Ln-7 y Ln-8) en los tres medios de suspensión usados, a excepción del fago CyC1, el cual presentó una inactivación del 99 % luego de 18-32 min, dependiendo del medio de suspensión (Tabla 10).

Cuando las suspensiones fágicas fueron incubadas a 72 °C, los fagos CHA, Ln-7 y Ln-8 exhibieron una notable resistencia al calor, debido a que este tratamiento, en general, no fue suficiente para lograr la inactivación del 99 % de los fagos dentro de los 45 min. Por el contrario, 5 min a esa temperatura fueron suficientes para la completa inactivación del fago CyC1 en los tres medios de suspensión ensayados. Para los fagos LDG y CHB se obtuvieron valores de T_{99} comprendidos entre 4 y 22 min, dependiendo del medio de suspensión utilizado (Tabla 10).

Adicionalmente, los fagos CHA, Ln-7 y Ln-8, que revelaron gran resistencia a los tratamientos a 72 °C, se sometieron a 80 °C usando LDR como medio de suspensión. Se obtuvo una inactivación completa de las partículas virales para los fagos Ln-7 y Ln-8 después de 15 min de tratamiento ($T_{99} = 4,6$ y $2,3$ min, respectivamente). El fago CHA mostró una marcada resistencia debido a que la inactivación total se obtuvo solamente después de 30 min de incubación a 80 °C.

Por otro lado, un tratamiento a 90 °C durante 2 min fue suficiente para lograr recuentos menores a 10 UFP/ml ($T_{99} < 2$ min), en todos los medios de suspensión y para los seis fagos estudiados (Tabla 10).

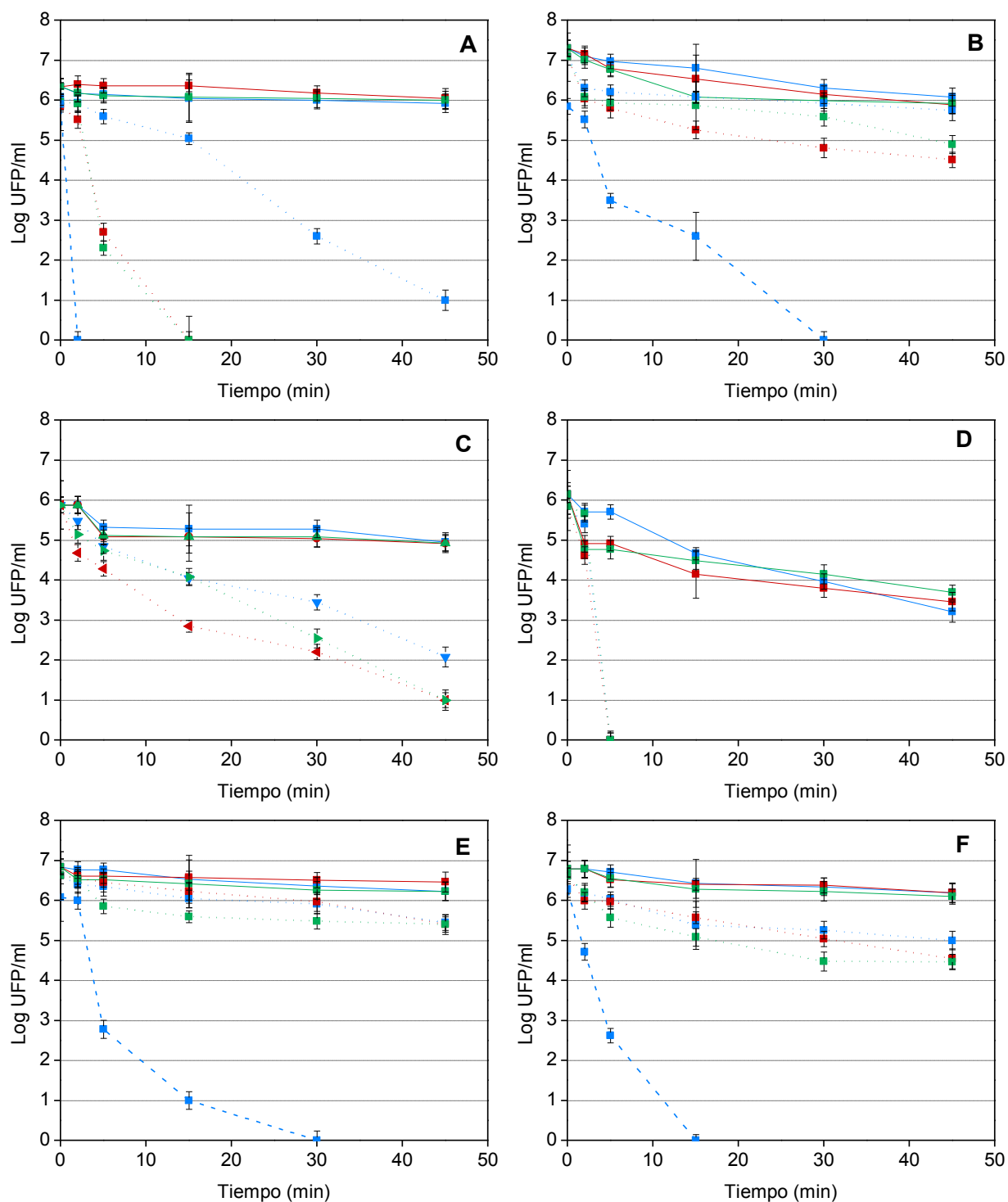


Figura 22. Cinéticas de inactivación térmica de los fagos LDG (A), CHA (B), CHB (C), CyC1 (D), Ln-7 (E) y Ln-8 (F) en MRS (■), TMG (■) y LDR (■) a 63 °C (—), 72 °C (····) y 80 °C (---). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Tabla 10. Resistencia térmica (T_{99}) de los fagos de *Leuconostoc* en estudio a 63 °C, 72 °C, 80 °C y 90 °C en diferentes medios de suspensión. Los valores son la media de tres determinaciones.

Fagos	T_{99} ^a									
	LDR ^b				MRS ^c			TMG ^d		
	63 °C	72 °C	80 °C	90 °C	63 °C	72 °C	90 °C	63 °C	72 °C	90 °C
LDG	>45	22,1	nd	<2	>45	4	<2	>45	4	<2
CHA	>45	>45	5	<2	>45	>45	<2	>45	>45	<2
CHB	>45	20	nd	<2	>45	8	<2	>45	18	<2
CyC1	29	2,9	nd	<2	32	1,2	<2	18	2,9	<2
Ln-7	>45	>45	4,6	<2	>45	>45	<2	>45	>45	<2
Ln-8	>45	>45	2,3	<2	>45	43	<2	>45	26	<2

^a T_{99} : tiempo (min) para lograr la inactivación del 99 % de partículas fágicas; ^b LDR: leche descremada reconstituida (10 % m/v); ^c MRS: de Man, Rogosa and Sharpe; ^d TMG: *buffer* Tris-Magnesio Gelatina; nd: no determinado

En general, no se observó una influencia clara de los diferentes medios de suspensión sobre la resistencia térmica de los fagos. Sin embargo, el medio LDR favoreció la resistencia térmica a 72 °C del fago LDG, ya que mantuvo su infectividad aún después de los 45 min de tratamiento. Por el contrario, cuando se realizaron los tratamientos en los otros dos medios de suspensión (caldo MRS y *buffer* TMG), el fago LDG se inactivó completamente a los 15 min de tratamiento (Figura 22).

2.6. Cinéticas de inactivación química

Cuando se trató a las partículas fágicas con etanol, se observó un comportamiento similar para todos los fagos estudiados. En general, entre todas las concentraciones ensayadas (50 %, 75 % y 100 % v/v), la solución de etanol al 75 % produjo la mayor inactivación fágica (Figura 23), con excepción del fago CyC1, observándose que 100 % fue la concentración más eficaz para inactivarlo. Por el contrario, la concentración de etanol menos eficaz fue aquella al 50 %. En particular, la solución de etanol al 75 % fue capaz de inactivar el 99 % de todas las partículas fágicas en menos de 12 min, logrando una inactivación completa de los fagos CHA, CHB, CyC1, Ln-7 y Ln-8 en menos de 30 min de incubación. En contraste, no fue posible la inactivación completa del fago LDG luego de 45 min a dicha concentración. El etanol ensayado en una concentración de 50 %, no tuvo efecto

significativo en la viabilidad fágica ($T_{99} > 45$ min), a excepción del fago CyC1, cuya infectividad decreció 3,5 órdenes luego de 45 min de tratamiento (Tabla 11 y Figura 23).

La efectividad del hipoclorito de sodio (NaClO) como biocida fue fago-dependiente (Figura 24 y Tabla 11). Se observó una gran resistencia de los fagos Ln-7 y Ln-8, detectándose partículas viables incluso luego del tratamiento con 800 ppm de cloro activo durante 45 min. A su vez, fueron necesarias concentraciones de 1400 ppm en el caso del fago LDG y 1600 ppm al ensayar los fagos Ln-7 y Ln-8, para lograr la destrucción total de las partículas virales luego de 45 min de tratamiento. Por otro lado, los fagos más sensibles fueron CHB y CyC1, los cuales fueron completamente inactivados luego de 45 min con 400 ppm y 30 min con 800 ppm, respectivamente.

El ácido peracético (0,15 % v/v) y los biocidas A (0,50 % v/v), C (2,5 % v/v) y E (0,8 % v/v) causaron una rápida inactivación fágica en todos los casos. Ninguno de los fagos fue detectado luego de 2 min de tratamiento con dichos biocidas, obteniéndose valores de T_{99} inferiores a 2 min (Tabla 11). Por su parte, una menor concentración del biocida A (0,25 % v/v) y el biocida F (2,0 % v/v) lograron inactivar el 99 % de las partículas fágicas en menos de 9 min ($T_{99} < 8,3$ min).

Si bien la eficiencia de los sanitizantes ensayados depende de sus componentes, un pH extremo también puede ser considerado un factor de inactivación para los viriones. Los valores de pH del ácido peracético y de los biocidas A (0,50 % v/v), C (2,5 % v/v), E (0,8 % v/v) y F (2,0 % v/v) fueron de 2,0; 9,4; 12,7; 1,7 y 10,3, respectivamente. Cuando se realizó un ensayo control para determinar el efecto de dichos valores de pH sobre los fagos en estudio, se observó que las soluciones con valores de pH inferiores a 2 y mayores a 12 conducen a la inactivación de la totalidad de las partículas fágicas en menos de 2 min de incubación.

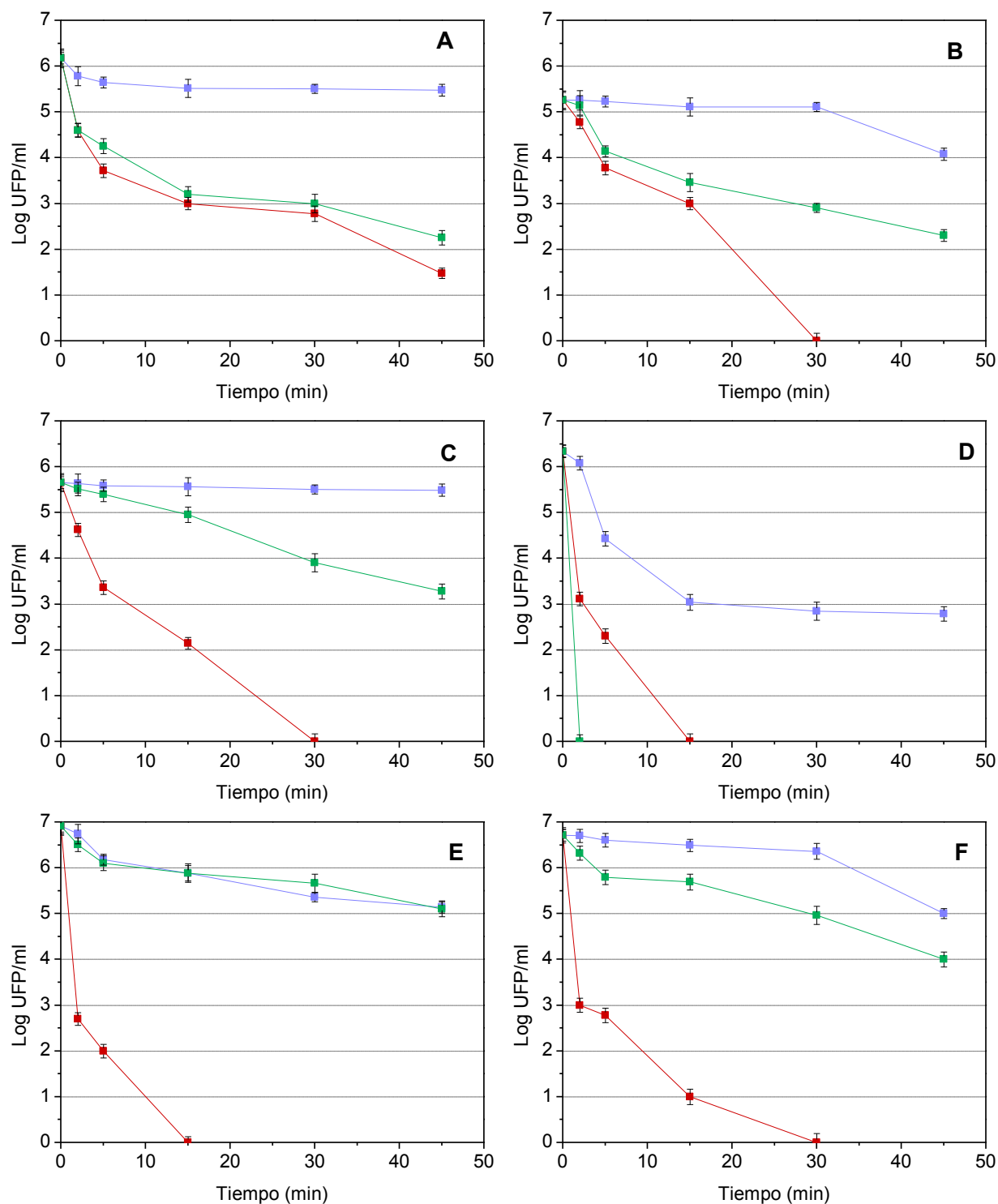


Figura 23. Cinéticas de inactivación química de los fagos LDG (A), CHA (B), CHB (C), CyC1 (D), Ln-7 (E) y Ln-8 (F) frente a diferentes concentraciones de etanol: 50 % (v/v) (■), 75 % (v/v) (■) y 100 % (v/v) (■). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

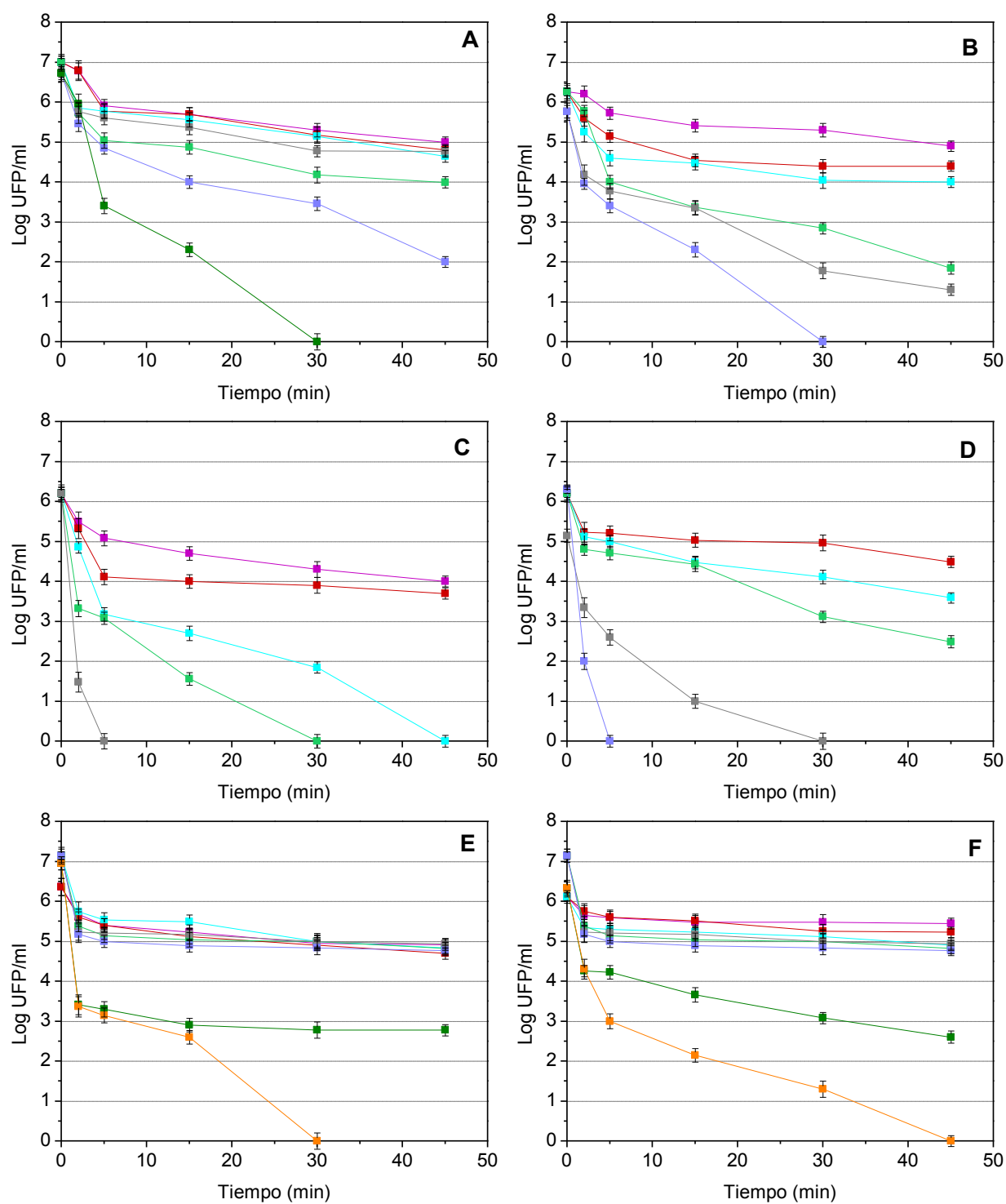


Figura 24. Cinéticas de inactivación química de los fagos LDG (A), CHA (B), CHB (C), CyC1 (D), Ln-7 (E) y Ln-8 (F) frente a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio: 200 ppm (■), 300 ppm (■), 400 ppm (■), 600 ppm (■), 800 ppm (■), 1000 ppm (■), 1400 ppm (■) y 1600 ppm (■). Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

Tabla 11. Resistencia (T_{99}) de los fagos de *Leuconostoc* estudiados a distintas concentraciones de biocidas.

Biocida	Concentración ^a	T_{99} ^b					
		Fagos					
		LDG	CHA	CHB	CyC-1	Ln-7	Ln-8
Etanol	50	>45	>45	>45	5,7	>45	>45
	75	4,3	12	4,7	2	<2	<2
	100	7,7	21,7	41	<2	>45	33,3
	200	>45	>45	32,8	>45	>45	>45
	300	>45	>45	5	28,1	>45	>45
	400	>45	21,7	3,9	18,1	>45	>45
Hipoclorito de sodio	600	10	4,4	<2	3	>45	>45
	800	7	6,4	<2	<2	>45	>45
	1000	6,1	2,9	nd	nd	5,6	7
	1400	3,9	nd	nd	nd	2,2	5,3
	1600	nd	nd	nd	nd	<2	2,1
	Ácido peracético	0,15	<2	<2	<2	<2	<2
Sanitizante A ^c	0,25	5,1	8,3	7	5,3	2,3	2,1
	0,50	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Sanitizante C ^c	2,50	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Sanitizante E ^c	0,80	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Sanitizante F ^c	2,00	6,7	5	5	2,2	2,4	2,5

nd: no determinado.

^a Concentración expresada como % (v/v) para etanol, ácido peracético y biocidas A, C, E y F; y como ppm para hipoclorito de sodio.

^b T_{99} : Tiempo (min) para lograr la inactivación del 99 % de las partículas fágicas.

^c Composición de sanitizantes: A (cloruro de amonio cuaternario), C (espuma clorada alcalina), E (nonil fenol etoxilado y ácido fosfórico) y F [N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropano-1,3-diamina].

3. Interacción de *Leuconostoc* con sus fagos específicos

3.1. Influencia del catión Ca^{2+} en el ciclo lítico de los fagos

Los fagos LDG, CHA y CHB fueron capaces de lisar a sus cepas indicadoras tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} (10 mM). Por el contrario, en ausencia del mencionado catión, no se observó lisis de las cepas indicadoras por parte de los fagos CyC1, Ln-7, Ln-8 y Ln-9.

3.2. Determinación del espectro de hospedadores y la eficiencia de plaqueo

Como puede observarse en la Tabla 12, los fagos líticos de *Leuconostoc* estudiados mostraron un amplio espectro de hospedadores, el cual se determinó y analizó mediante tres metodologías: *Spot test*, Test de turbidez, y eficiencia de plaqueo (EOP). Por definición, el EOP de cada fago ensayado sobre su cepa indicadora, resultaría igual a 1 (Materiales y métodos, Sección 5.2).

De acuerdo al Test de turbidez, el fago LDG fue capaz de lisar a todas las cepas en estudio (tanto *Leuc. mesenteroides* como *Leuc. pseudomesenteroides*) (Tabla 12). De manera similar, acorde a lo observado por *Spot test*, este fago infectó a todas las cepas de *Leuconostoc* estudiadas, resultado evidenciado mediante la formación de placas de lisis en todos los casos. Cuando se calculó la eficiencia de plaqueo (EOP), los valores para el fago LDG sobre las cepas de *Leuc. mesenteroides* en estudio fueron bajos ($EOP < 8 \times 10^{-7}$) (Tabla 12). En la Figura 25 se observan los títulos del fago LDG con cada una de las cepas de *Leuc. mesenteroides* (C19A, C19B, CyC, D4b, D6a y L79-1) y con la cepa *Leuc. pseudomesenteroides* R707 (indicadora).

En medio líquido (Test de turbidez), los fagos CHA y CHB mostraron similar espectro de hospedadores, y ambos fagos fueron capaces de lisar a todas las cepas de *Leuconostoc* estudiadas. En medio agarizado (*Spot test*), los fagos CHA y CHB revelaron resultados negativos (ausencia de placas de lisis) sobre *Leuc. pseudomesenteroides* R707 y *Leuc. mesenteroides* L79-1. Los valores de EOP con las cepas en estudio fueron inferiores a 5×10^{-5} .

Por otro lado, de acuerdo al Test de turbidez, los fagos Ln-7 y Ln-8 fueron capaces de lisar a todas las cepas en estudio (tanto *Leuc. mesenteroides* como *Leuc. pseudomesenteroides*) (Tabla 12). Por el contrario, cuando se realizó la técnica de *Spot test* (medio agarizado), estos fagos solo mostraron resultados positivos (presencia de placas de lisis) con las cepas de *Leuc. mesenteroides* D4b, D6a y CyC. Cuando se calculó la eficiencia de plaqueo (EOP), los valores para dichos fagos sobre las cepas en estudio fueron inferiores a 2×10^{-7} .

Los fagos CyC1, CyC2, Ln-6 y Ln-9 fueron capaces de lisar en medio líquido (Test de turbidez) a todas las cepas de *Leuc. mesenteroides* en estudio; sin embargo, no fueron capaces de lisar a *Leuc. pseudomesenteroides* R707. Cuando se realizaron los ensayos en

medio agarizado (*Spot test*), solamente se observaron zonas de inhibición sobre las cepas CyC, D4b, D6a y L79-1 (*Leuc. mesenteroides*). Cuando se calculó la eficiencia de plaqueo (EOP), los valores fueron inferiores a 5×10^{-6} .

Tabla 12. Espectro de hospedadores de los fagos de *Leuconostoc* estudiados, empleando tres metodologías.

Cepa	Fago																										
	LDG			CHA			CHB			CyC1			CyC2			Ln-6			Ln-7			Ln-8			Ln-9		
	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP	TT	ST	EOP
R707 ^a	+	+	1	+	-	1 x10 ⁻⁸	+	-	2 x10 ⁻⁵	-	-	8 x10 ⁻⁷	-	-	3 x10 ⁻⁸	-	-	2 x10 ⁻⁸	+	-	3 x10 ⁻⁸	+	-	2 x10 ⁻⁷	-	-	3 x10 ⁻¹⁰
C19A ^b	+	+	2 x10 ⁻⁷	+	+	1	+	+	1	+	-	<1 x10 ⁻⁸	+	-	<1 x10 ⁻⁹	+	-	<1 x10 ⁻⁹	+	-	6 x10 ⁻⁹	+	-	5 x10 ⁻⁹	+	-	9 x10 ⁻⁹
C19B ^b	+	+	3 x10 ⁻⁷	+	+	0,2	+	+	1	+	-	<1 x10 ⁻⁸	+	-	<1 x10 ⁻⁹	+	-	<1 x10 ⁻⁹	+	-	2 x10 ⁻⁸	+	-	9 x10 ⁻⁹	+	-	9 x10 ⁻⁹
CYC ^b	+	+	8 x10 ⁻⁸	+	+	7 x10 ⁻⁷	+	+	5 x10 ⁻⁵	+	+	1	+	+	1	+	+	1	+	+	2 x10 ⁻⁷	+	+	2 x10 ⁻⁷	+	+	1
D4b ^b	+	+	1 x10 ⁻⁷	+	+	2 x10 ⁻⁸	+	+	9 x10 ⁻⁶	+	+	5 x10 ⁻⁶	+	+	3 x10 ⁻⁶	+	+	2 x10 ⁻⁶	+	+	1	+	+	1	+	+	3 x10 ⁻⁷
D6a ^b	+	+	8 x10 ⁻⁷	+	+	4 x10 ⁻¹⁰	+	+	4 x10 ⁻⁶	+	+	4 x10 ⁻⁶	+	+	3 x10 ⁻⁶	+	+	2 x10 ⁻⁶	+	+	1	+	+	1	+	+	2 x10 ⁻⁷
L79-1 ^b	+	+	1 x10 ⁻⁷	+	-	1 x10 ⁻⁹	+	-	4 x10 ⁻⁷	+	+	1	+	+	1	+	+	1	+	-	1 x10 ⁻⁸	+	-	1 x10 ⁻⁸	+	+	1

^a *Leuc. pseudomesenteroides*; ^b *Leuc. mesenteroides*; TT: Test de turbidez (+, -; presencia y ausencia de lisis, respectivamente); ST: *Spot test* (+, -; presencia y ausencia de zonas de inhibición, respectivamente); EOP (*Efficiency of Plaquing*): eficiencia de plaqueo; Resultados sombreados en gris corresponden a los obtenidos con las respectivas cepas indicadoras.

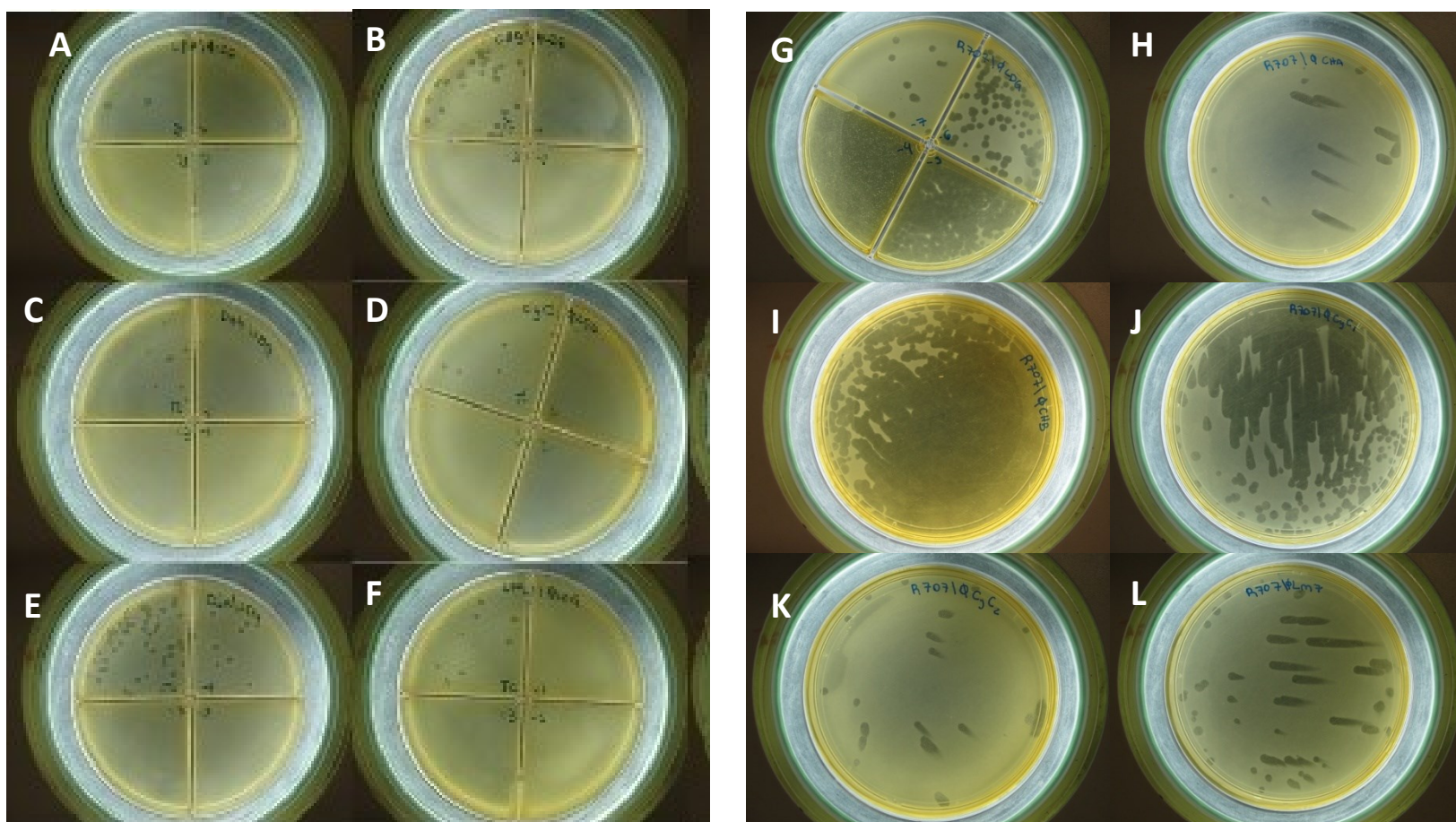


Figura 25. Placas de lisis obtenidas cuando las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* C19A (A), C19B (B), D4b (C), CyC (D), D6a (E), L79-1 (F) fueron infectadas con el fago LDG, y *Leuconostoc pseudomesenteroides* R707 fue infectada con los fagos LDG (G), CHA (H), CHB (I), CyC1 (J), CyC2 (K) y Ln-7 (L).

3.3. Ciclos de multiplicación fágica (*Burst size*)

Los parámetros de multiplicación fágica fueron calculados a partir de las curvas de crecimiento en un paso (Figura 26).

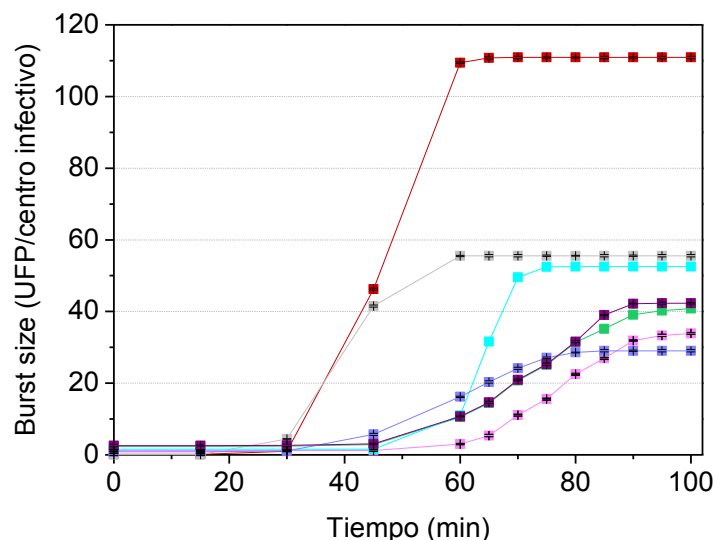


Figura 26. Curvas de crecimiento en un paso obtenidas para los fagos LDG (■), CHA (■), CHB (■), CyC1 (■), Ln-7 (■), Ln-8 (■) y Ln-9 (■), durante la infección de sus correspondientes cepas indicadoras. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD .

Los fagos LDG, CHB, CyC1, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 presentaron valores de *burst size* bajos (29 - 56 UFP/centro de infección), mientras que para el fago CHA el mismo fue más elevado (111 UFP/centro de infección). En todos los casos, el tiempo de latencia estuvo comprendido entre 29 y 62 min, mientras que los tiempos de *burst* oscilaron entre 54 y 96 min (Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros de multiplicación de los fagos de *Leuconostoc* estudiados. Los valores son la media de tres determinaciones.

Fagos	Período de latencia (min)	Tiempo de <i>burst</i> (min)	<i>Burst size</i> (UFP/centro de infección)
LDG	62	94	34
CHA	37	59	111
CHB	30	54	56
CyC1	53	96	41
Ln-7	57	74	53
Ln-8	29	79	29
Ln-9	51	90	48

3.4. Caracterización de la adsorción

Las cinéticas de adsorción de los fagos de *Leuconostoc* en estudio, sobre sus cepas indicadoras, se muestran en la Figura 27.

A los 5 min de incubación a 30 °C se obtuvieron valores de adsorción superiores al 99 % para todos los fagos, valor que se mantuvo estable hasta los 15-20 min. Por este motivo, para evaluar el efecto de la temperatura, el pH, el estado fisiológico celular y los valores de m.o.i., las cinéticas de adsorción se extendieron por un máximo 20 min de incubación.

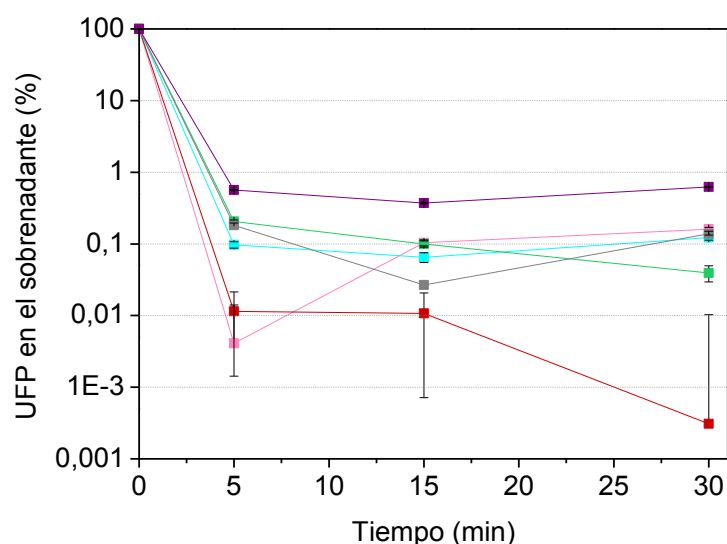


Figura 27. Cinéticas de adsorción en caldo MRS-Ca, a 30 °C, de los fagos LDG (■), CHA (■), CHB (■), CyC1 (■), Ln-7 (■) y Ln-8 (■) sobre sus respectivas cepas indicadoras. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

3.4.1. Influencia del calcio

Cuando se evaluó la influencia del calcio (CaCl_2 10 mM) en la adsorción fágica, se observó que esta etapa del ciclo lítico no se vio modificada por la ausencia de este catión en ninguno de los casos. Luego de 20 min de incubación a 30 °C, más del 90 % (fagos CHA, CHB y CyC1) o 99 % (fagos LDG, Ln-7, Ln-8 y Ln-9) de las partículas fágicas fueron adsorbidas sobre sus cepas indicadoras en caldo MRS con y sin agregado de calcio (Figura 28).

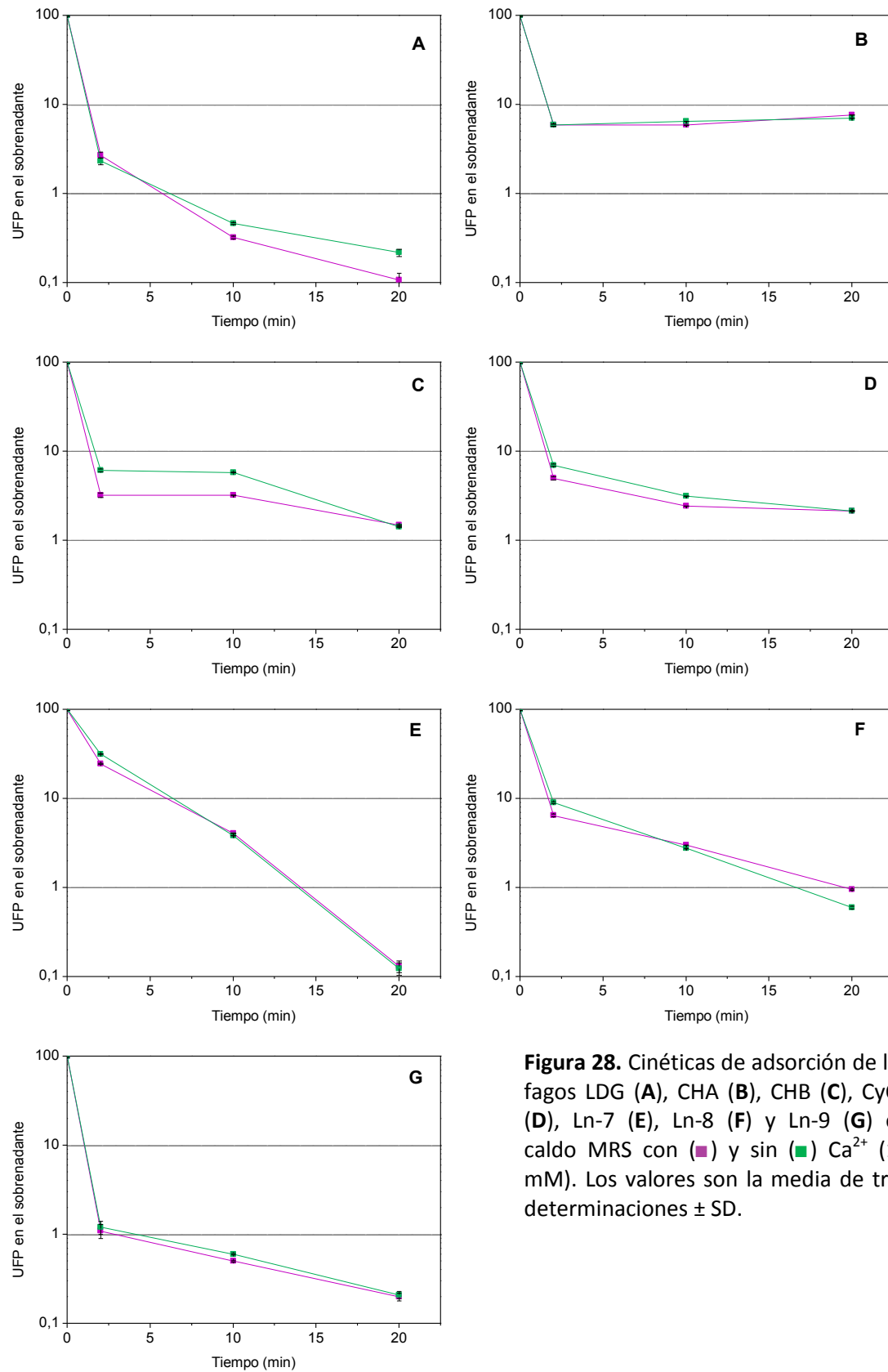


Figura 28. Cinéticas de adsorción de los fagos LDG (A), CHA (B), CHB (C), CyC1 (D), Ln-7 (E), Ln-8 (F) y Ln-9 (G) en caldo MRS con (■) y sin (■) Ca²⁺ (10 mM). Los valores son la media de tres determinaciones ± SD.

3.4.2. Influencia de la temperatura

Los resultados obtenidos con respecto al efecto de la temperatura de incubación sobre la adsorción fágica se muestran en la Figura 29. La adsorción de los fagos LDG, CHA, CyC1 y Ln-9 sobre sus respectivas cepas indicadoras no fue significativamente afectada por las distintas temperaturas ensayadas (0 °C, 10 °C, 20 °C, 32 °C, 42 °C y 50 °C), siendo ésta mayor a 94 % en todos los casos. Por el contrario, la adsorción del fago CHB fue notablemente afectada a 42 °C y 50 °C, disminuyendo a valores menores a 80 %. Por otro lado, la adsorción de los fagos Ln-7 y Ln-8 fue elevada entre 0 °C y 42 °C, pero disminuyó a valores cercanos a 80 % cuando la temperatura de incubación se incrementó a 50 °C.

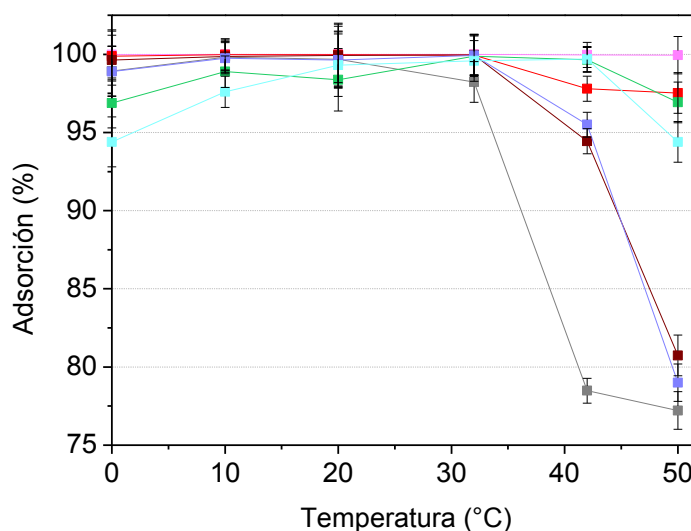


Figura 29. Efecto de la temperatura de incubación sobre la adsorción (20 min en caldo MRS-Ca) de los fagos LDG (■), CHA (■), CHB (■), CyC1 (■), Ln-7 (■), Ln-8 (■) y Ln-9 (■), sobre sus cepas indicadoras. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

3.4.3. Influencia del pH

La Figura 30 muestra los resultados obtenidos cuando se ensayó la adsorción de los fagos de *Leuconostoc* estudiados a distintos valores de pH. De acuerdo a lo obtenido, los valores de adsorción fueron elevados en todo el rango de pH estudiado (entre 4 y 9), siendo mayor al 97 %; sin embargo, el máximo valor se obtuvo entre pH 5 y 7, con un mínimo de 99 % de viriones adsorbidos.

Para descartar el efecto del pH sobre la viabilidad celular, en paralelo a los ensayos de adsorción, se realizaron controles de viabilidad en soluciones ajustadas a

los distintos valores de pH testeados. La viabilidad de las cepas indicadoras no fue afectada luego de 20 min de incubación a los diferentes valores de pH ensayados.

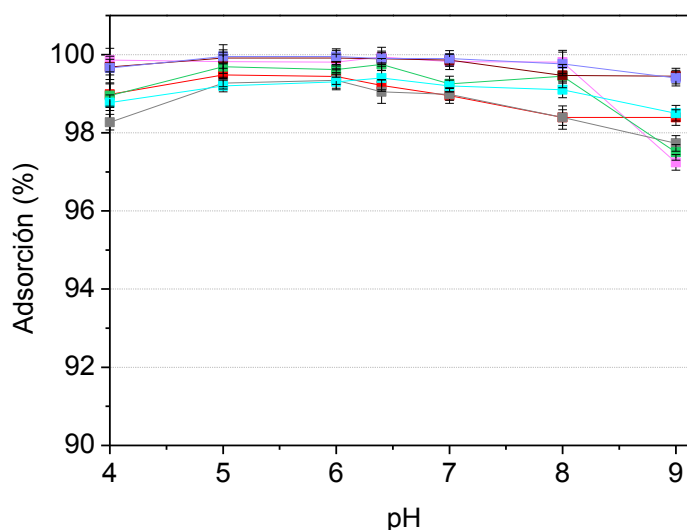


Figura 30. Efecto del pH de incubación sobre la adsorción (20 min en caldo MRS-Ca) de los fagos LDG (◆), CHA (■), CHB (■), CyC1 (■), Ln-7 (■), Ln-8 (■) y Ln-9 (■) sobre sus cepas indicadoras. Los valores son la media de tres determinaciones \pm SD.

3.4.4. Influencia del estado fisiológico celular

Se determinó la influencia del estado fisiológico celular sobre la adsorción fágica mediante dos técnicas; una de ellas consistió en emplear células tratadas térmicamente y la otra, utilizando células tratadas con un inhibidor de la síntesis de proteínas (cloranfenicol).

Cuando las células fueron inactivadas térmicamente (no viables), se observó una disminución aproximada de 1 - 2 órdenes logarítmicos en las tasas de adsorción de los fagos LDG, CHA, CHB, Ln-7 y Ln-8 luego de 20 min de incubación, en comparación a los valores obtenidos sobre células control (viables). Sin embargo, los fagos CyC1 y Ln-9 fueron capaces de adsorberse tanto sobre células viables como tratadas térmicamente (no viables), siendo ésta elevada en ambas condiciones fisiológicas del cultivo celular (>99 %) (Figura 31).

Por otro lado, cuando las células bacterianas fueron tratadas con cloranfenicol (250 μ g/ml), no se observaron diferencias en los valores de adsorción fágica con respecto a los obtenidos con células viables (Figura 31).

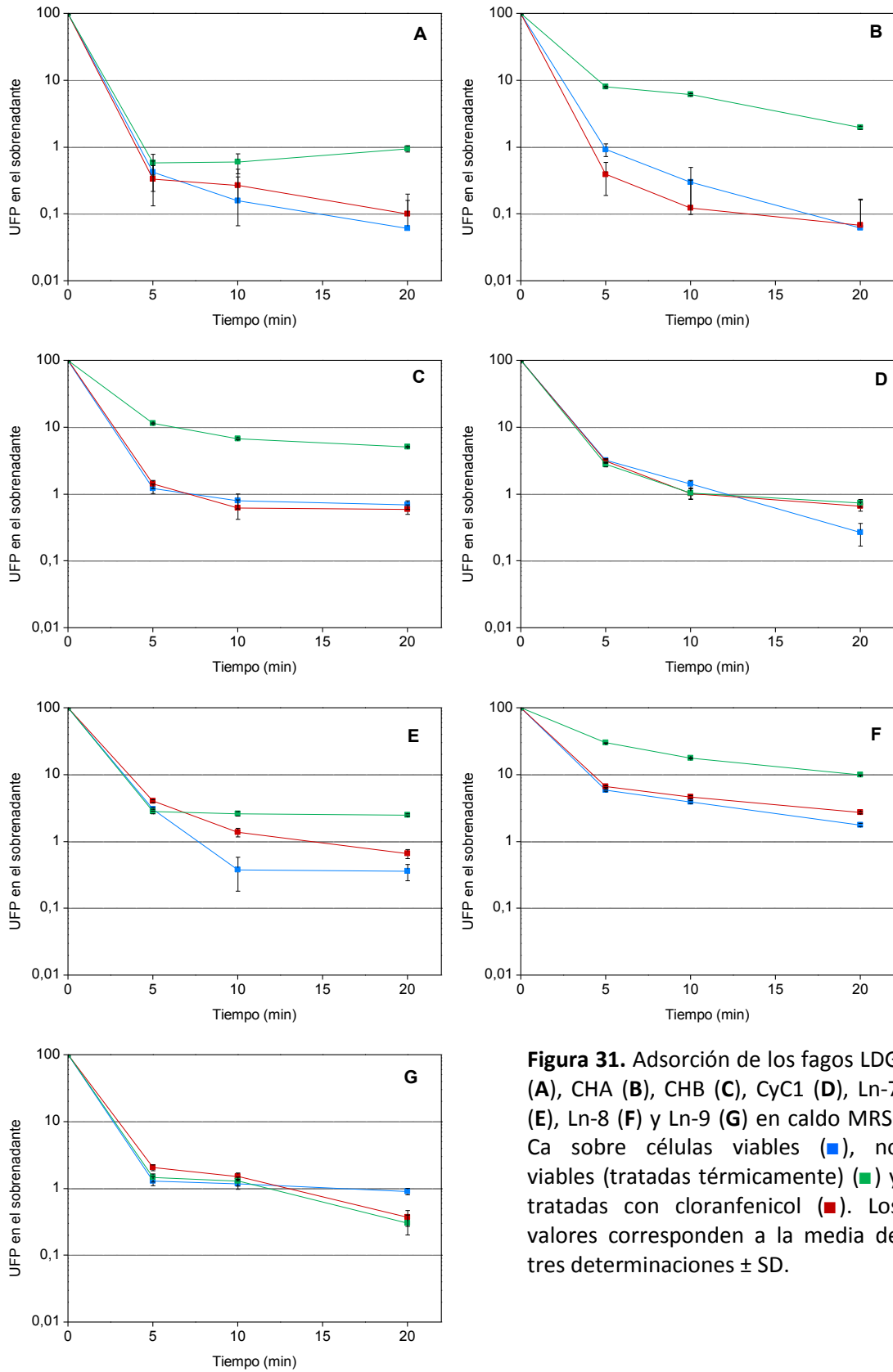


Figura 31. Adsorción de los fagos LDG (A), CHA (B), CHB (C), CyC1 (D), Ln-7 (E), Ln-8 (F) y Ln-9 (G) en caldo MRS-Ca sobre células viables (■), no viables (tratadas térmicamente) (■) y tratadas con cloranfenicol (■). Los valores corresponden a la media de tres determinaciones \pm SD.

3.4.5. Influencia de la multiplicidad de infección (m.o.i.)

La influencia de los distintos valores de m.o.i. sobre la adsorción fágica se muestra en la Figura 32. Para todos los fagos de *Leuconostoc* en estudio, la adsorción fue constante y máxima ($\geq 99\%$) para valores de m.o.i. entre 10^{-4} y 1; en tanto que para valores de m.o.i. mayores (entre 10 y 100), la adsorción fue notablemente menor. Esto podría explicarse considerando la mayor proporción de viriones respecto al número de sitios receptores ubicados sobre las paredes celulares bacterianas y disponibles para la interacción.

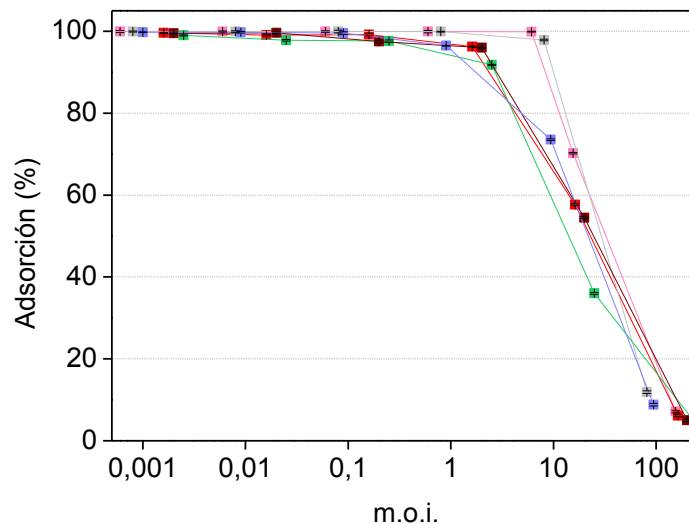


Figura 32. Influencia de la multiplicidad de infección (m.o.i.) sobre la adsorción de los fagos LDG (■), CHA (■), CHB (■), CyC1 (■) y Ln-8 (■). Los valores corresponden a la media de tres determinaciones \pm SD.

3.4.6. Estimación del número de fagos adsorbidos por célula

Para calcular el promedio de fagos adsorbidos sobre cada célula bacteriana, se estimó el número de fagos adsorbidos por célula para diferentes valores de m.o.i.c. (definido en Materiales y Métodos, Sección 5.4.5), teniendo en cuenta la reducción de fagos libres (en el sobrenadante) y el número de células bacterianas individuales presentes.

Como se observa en la Figura 33, la adsorción inicial es lineal y el número de fagos adsorbidos por célula se correlaciona fuertemente con la m.o.i.c. empleado. Sin

embargo, para valores de m.o.i.c. muy elevados (>10), se alcanza una meseta y el número de viriones adsorbidos por célula alcanza un límite de 3–4, aproximadamente.

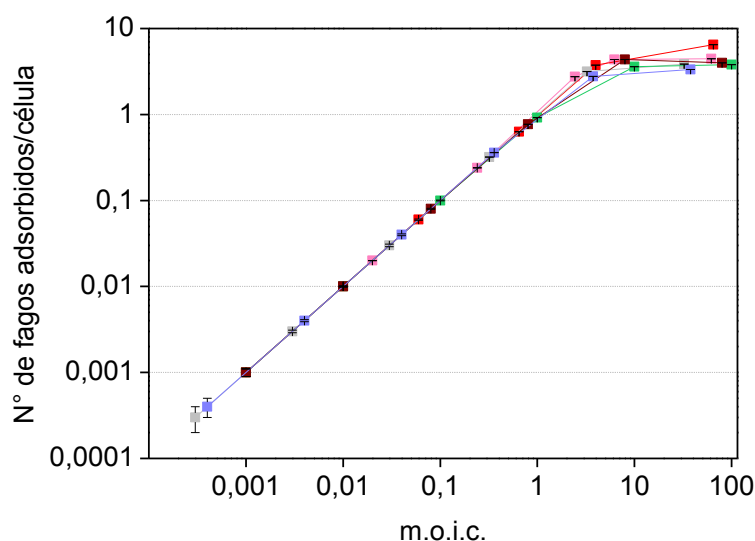


Figura 33. Número de fagos LDG (■), CHA (■), CHB (■), CyC1 (■), Ln-7 (■) y Ln-8 (■) adsorbidos por célula bacteriana. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones \pm SD.

3.5. Caracterización preliminar de receptores fágicos

Antes de comenzar con los ensayos específicos, se realizaron controles de adsorción sobre las paredes celulares y las células enteras para asegurar que no hubiera existido pérdida importante de material durante los tratamientos y lavados. Los valores de adsorción fueron superiores al 90 % en todos los casos, por lo que se procedió con los ensayos previstos.

Como puede observarse en la Tabla 14, los porcentajes de adsorción fágica sobre células enteras y sobre paredes celulares tratadas con mutanolisina o TCA, fueron bajos (≤ 30 %) con respecto a los controles. La mutanolisina es una enzima que hidroliza el peptidoglicano de la pared celular, mientras que el ácido tricloroacético (TCA, 5 % v/v) actúa sobre componentes de naturaleza hidrocarbonada de la pared celular, removiendo una fracción soluble de los polisacáridos, dejando una fracción insoluble y los ácidos teicoicos inalterados (Callegari, 1992). Por el contrario, los valores de adsorción sobre células enteras o paredes celulares tratadas con proteinasa K o SDS fueron elevados (≥ 86 %) y muy similares a los obtenidos para las paredes control. La proteinasa K hidroliza uniones peptídicas, mientras que el SDS remueve y

desnaturaliza las proteínas de la pared celular bacteriana sin afectar al peptidoglicano ni a las moléculas ligadas covalentemente a él.

Estos resultados indicarían la existencia de componentes de origen hidrocarbonado en los receptores reconocidos por los fagos estudiados.

Tabla 14. Adsorción fágica (caldo MRS-Ca, 20 min a 30 °C) sobre células enteras o paredes de las cepas sensibles tratadas química y enzimáticamente. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones.

Tratamiento	Adsorción fágica (%)					
	Fagos					
	LDG ^a	CHA ^b	CHB ^b	CyC1 ^b	Ln-7 ^b	Ln-8 ^b
Control	99,0	98,0	99,0	99,8	99,6	99,5
Proteinasa K (0,10 mg/ml)	86,0	96,7	94,8	97,1	94,1	95,2
SDS (1 % m/v)	90,0	93,0	94,5	98,4	92,2	93,4
Mutanolisina (50 U/ml)	12,0	14,0	0	23,0	15,2	19,5
TCA (5 % m/v)	30,0	2,3	1,1	29,0	13,2	17,9

^a Ensayo sobre paredes celulares, ^b Ensayo sobre células enteras.

4. Aislamiento de mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de cepas de *Leuconostoc*

Las cepas *Leuc. mesenteroides* C19A, C19B, D4b, D6a y L79-1, y *Leuc. pseudomesenteroides* R707 fueron empleadas para obtener mutantes espontáneos resistentes a sus respectivos fagos líticos. Además, se preparó un “cóctel” con los fagos LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9, con la finalidad de utilizarlo para aislar mutantes espontáneos fagorresistentes a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1. Cabe destacar que el aislamiento de mutantes a partir de *Leuc. mesenteroides* C19A, C19B, D4b y D6a resultó mucho más complejo que el aislamiento a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1 y *Leuc. pseudomesenteroides* R707.

Los resultados respecto de la confirmación de la fagorresistencia y de la eficiencia en la recuperación de mutantes se muestran en la Tabla 15. Con la metodología de Cultivos Secundarios, y a partir de *Leuc. pseudomesenteroides* R707, fue posible obtener 8 mutantes presuntivos usando el fago LDG, luego de 24 h de

incubación a 30 °C. Por otro lado, a partir de *Leuc. mesenteroides* C19A no fue posible obtener mutantes presuntivos, aún después de 9 días de incubación. Sin embargo, a partir de *Leuc. mesenteroides* C19B, cuyo perfil de RAPD es similar al de la cepa C19A, se aislaron 4 derivados presuntivos luego de 9 días de incubación a 30 °C. A partir de *Leuc. mesenteroides* D4b y D6a, cuyos perfiles de RAPD son similares, se aislaron 4 y 15 mutantes presuntivos respectivamente, luego de 4 días de incubación. Por su parte, a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1 fue posible aislar 20 mutantes presuntivos utilizando el fago Ln-9, y 10 mutantes presuntivos usando el cóctel de fagos, luego de 24 h de incubación a 30 °C.

Todos los mutantes fagorresistentes presuntivos aislados fueron evaluados mediante el Test de turbidez para confirmar su fagorresistencia; aquellos que resistieron tres repiques sucesivos, fueron considerados mutantes espontáneos fagorresistentes confirmados. De los 8 mutantes presuntivos resistentes a LDG obtenidos a partir de *Leuc. mesenteroides* R707, siete fueron confirmados como tales. En contraste, de las variantes presuntivas obtenidas a partir de *Leuc. mesenteroides* C19B y D4b, no se recuperó ningún derivado resistente verdadero.

De los 15 derivados aislados a partir de *Leuc. mesenteroides* D6a, seis fueron confirmados como mutantes resistentes frente al fago Ln-8. Por otro lado, la totalidad de los derivados presuntivos aislados a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1, fueron confirmados como mutantes fagorresistentes, de los cuales 20 habían sido aislados luego del enfrentamiento de la cepa L79-1 con el fago Ln-9, y los 10 clones restantes, luego de exponer dicha cepa al cóctel compuesto por 6 fagos. Adicionalmente, cabe señalar que todos los mutantes obtenidos a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1 fueron resistentes a todos los fagos ensayados (LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9), ya sea individualmente o como cóctel.

La eficiencia de aislamiento de mutantes fagorresistentes a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1 fue llamativamente elevada en comparación a la observada para el resto de cepas de *Leuc. mesenteroides* (Tabla 15).

Tabla 15. Mutantes espontáneos fagorresistentes obtenidos a partir de cepas fago-sensibles de *Leuconostoc*, mediante Cultivos Secundarios.

Cepa sensible	Fago lítico	Nº de mutantes fagorresistentes		Eficiencia de recuperación de mutantes confirmados (%)
		Presuntivos	Confirmados	
R707	LDG	8	7	87,5
C19A	CHA	0	0	–
C19B	CHB	4	0	0
D4b	Ln-7	4	0	0
D6a	Ln-8	15	6	40
L79-1	Ln-9	20	20	100
	Cóctel ^a	10	10	100

^a Cóctel compuesto por los fagos LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9.

4.1. Estabilidad de la fagorresistencia y nivel de fagorresistencia (EOP, *Efficiency of Plaquing*)

Los mutantes fagorresistentes confirmados mostraron elevada estabilidad del fenotipo fagorresistencia, ya que todos fueron capaces de resistir una fuerte presión fágica provocada mediante la continua adición de fagos durante siete repiques sucesivos. Adicionalmente, los mutantes confirmados presentaron niveles de fagorresistencia extremadamente altos, evidenciados por valores de EOP $<10^{-10}$ en todos los casos.

4.2. Caracterización molecular de los mutantes espontáneos fagorresistentes

Para llevar a cabo la caracterización molecular de los mutantes fagorresistentes se seleccionó una variante representativa de cada grupo: L79-2 y COC 1 (derivadas de *Leuc. mesenteroides* L79-1 usando el fago Ln-9 o el cóctel, respectivamente), D6a10 (derivada de *Leuc. mesenteroides* D6a) y R707-1 (derivada de *Leuc. pseudomesenteroides* R707).

El dendrograma obtenido luego de la amplificación de cada cepa y sus variantes, con los *primers* M13 y 1254, mostró elevada homología (>90 %) entre cada

una de las cepas madres sensibles y sus correspondientes derivados fagorresistentes (Figura 34). Estos resultados demuestran que no existen diferencias genéticas significativas que pudieran detectarse por RAPD, entre las variantes fagorresistentes y sus cepas madres sensibles, a la vez que se descarta la posibilidad de contaminaciones durante el proceso de aislamiento.

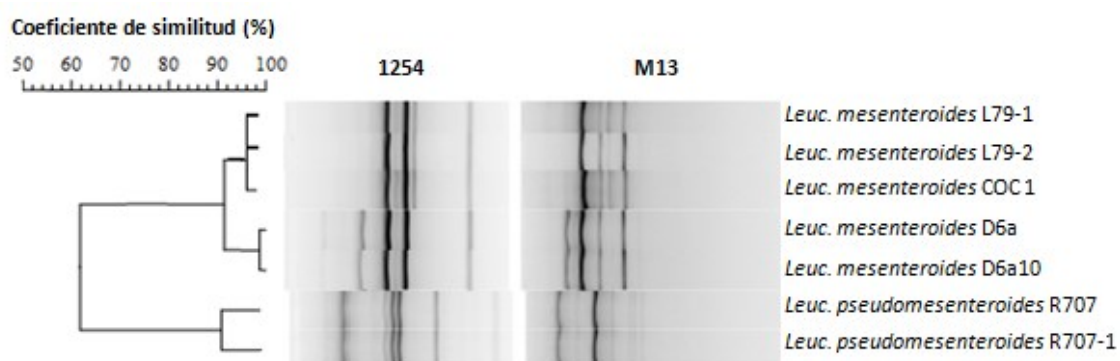


Figura 34. Dendrograma obtenido por comparación (BioNumerics™ V 6.0, Applied Maths BVBA, Bélgica) y reagrupamiento (UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) de los perfiles RAPD-PCR de *Leuc. mesenteroides* L79-1, *Leuc. mesenteroides* D6a, *Leuc. pseudomesenteroides* R707 y sus mutantes fagorresistentes, usando los primers 1254 y M13.

4.3. Tasas de adsorción fágica

Se estudiaron las tasas de adsorción fágica de los mutantes espontáneos fagorresistentes, en comparación con las cepas madres sensibles a fagos de las cuales fueron aislados. Para ello, se seleccionaron seis mutantes fagorresistentes derivados de *Leuc. mesenteroides* D6a, seis mutantes de *Leuc. pseudomesenteroides* R707, y nueve derivados de *Leuc. mesenteroides* L79-1. De las 9 variantes fagorresistentes aisladas a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1, seis de las aisladas bajo presión del fago Ln-9 y las tres restantes utilizando el cóctel de fagos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó diversidad en los porcentajes de adsorción de los fagos sobre cada uno de los mutantes fagorresistentes analizados (Figura 35). En particular, los derivados fagorresistentes aislados a partir de *Leuc. pseudomesenteroides* R707 presentaron moderadas tasas de adsorción (52 % - 80 %). Similar comportamiento fue exhibido por la mayoría de los mutantes espontáneos analizados y obtenidos a partir de *Leuc. mesenteroides* D6a, presentando tasas de

adsorción entre 57 % y 62 %. Por otro lado, los derivados de *Leuc. mesenteroides* L79-1, aislados frente al fago Ln-9, revelaron tasas de adsorción variables entre 10 % y 62 % (Figura 35).

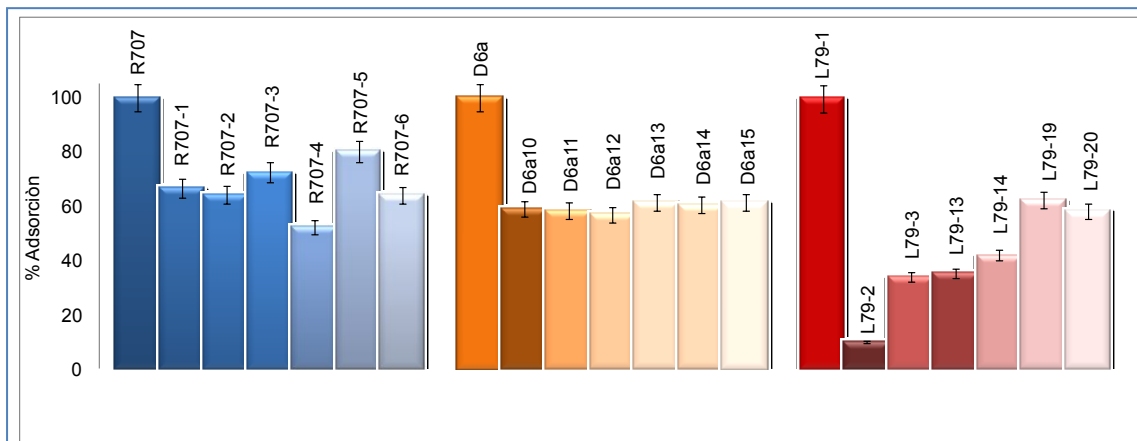


Figura 35. Tasas de adsorción (% de partículas fágicas adsorbidas a 30 °C, durante 20 min) de los fagos LDG (■), Ln-8 (■) y Ln-9 (■) sobre las cepas sensibles *Leuc. pseudomesenteroides* R707, *Leuc. mesenteroides* D6a y *Leuc. mesenteroides* L79-1 y sobre sus respectivos mutantes espontáneos fagorresistentes. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones \pm SD.

Las variantes fagorresistentes aisladas a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1 bajo presión del cóctel fágico, exhibieron elevados porcentajes de adsorción (>99 %) cuando se realizó el ensayo utilizando dicho cóctel (datos no mostrados). Sin embargo, las tasas de adsorción fueron variables cuando la adsorción se llevó a cabo con cada uno de los fagos por separado (Figura 36). En particular, cuando los mutantes fagorresistentes obtenidos con el cóctel se pusieron en contacto con el fago LDG, las tasas de adsorción fueron bajas (~30 %); frente a los fagos Ln-7 y Ln-8 las mismas fueron moderadas (entre 35 y 67 %), mientras que con los fagos CHA, CHB y Ln-9 las tasas de adsorción resultaron elevadas (~99 %).

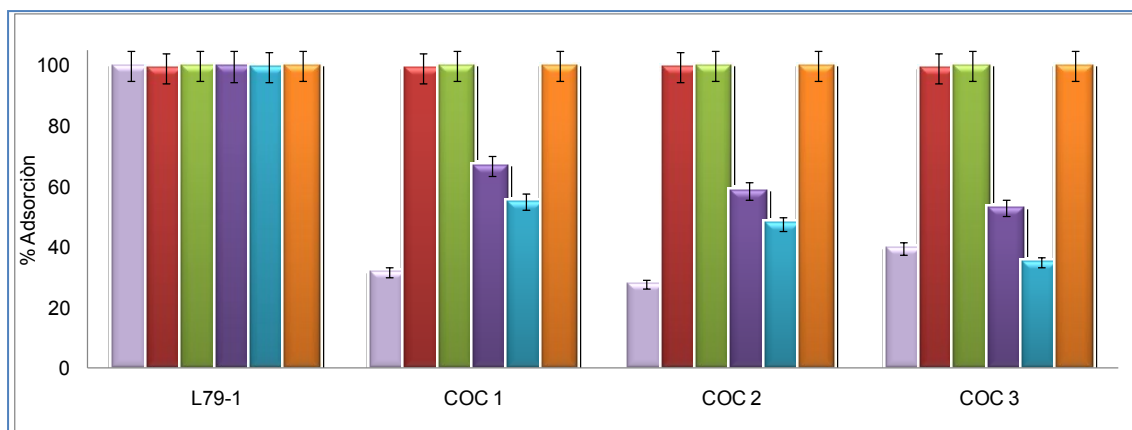


Figura 36. Tasas de adsorción (% de partículas fágicas adsorbidas a 30 °C, durante 20 min) de los fagos LDG (■), CHA (■), CHB (■), Ln-7 (■), Ln-8 (■) y Ln-9 (■) sobre *Leuc. mesenteroides* L79-1 y los mutantes espontáneos fage-resistentes (COC 1, COC 2 y COC 3) aislados utilizando el cóctel de fagos. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones \pm SD.

4.4. Desarrollo de los mutantes fage-resistentes en leche

Las cinéticas de acidificación en leche descremada reconstituida (LDR) de los mutantes espontáneos fage-resistentes se muestran en la Figura 37. Para investigar el desarrollo en LDR, y en base a los resultados obtenidos en la caracterización del fenotipo fage-resistencia (estabilidad de la fage-resistencia y tasas de adsorción fágica, Secciones 4.2 y 4.3), se seleccionaron 10 mutantes fage-resistentes. De las 10 variantes elegidas, dos de ellas fueron aisladas a partir de *Leuc. pseudomesenteroides* R707 bajo presión del fago LDG, tres a partir de *Leuc. mesenteroides* D6a bajo presión del fago Ln-8, y las 5 restantes a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1, de las cuales dos fueron obtenidos bajo presión del fago Ln-9 y las tres restantes utilizando el cóctel de fagos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Leuc. pseudomesenteroides* R707 y sus mutantes fage-resistentes manifestaron escaso desarrollo en LDR durante el tiempo de incubación (24 h), aumentando el recuento de células viables en sólo un orden logarítmico (Tabla 16). A su vez, esta cepa y sus mutantes fage-resistentes fueron incapaces de acidificar la leche, hecho demostrado por la leve disminución del pH así como por la escasa acidez generada (22 °D) (Figura 37A y Tabla 16).

Por otro lado, *Leuc. mesenteroides* D6a y los derivados fage-resistentes estudiados, presentaron un comportamiento similar durante las etapas iniciales, alcanzando valores de pH entre 5,7 y 5,9 a las 4 h de incubación a 30 °C. Sin embargo, a las 24 h de incubación, la cepa indicadora (sensible a fagos) demostró mejor

desempeño en LDR, en comparación a los mutantes fagorresistentes estudiados, ya que alcanzó mayores recuentos celulares (2×10^9 UFC/ml), menor valor de pH (4,8) y mayor acidez (88,2 °D) (Figura 37B). Por último, *Leuc. mesenteroides* L79-1 y sus mutantes espontáneos fagorresistentes presentaron moderado desarrollo en LDR, aumentando el recuento de células viables en dos ordenes logarítmicos luego de 24 h de incubación. Los valores de pH fueron cercanos a 5,4 y la acidez producida osciló entre 70 °D y 83 °D, siendo la cepa indicadora L79-1 y el mutante COC 2 los que presentaron mayores valores de acidez (Figura 37C).

Tabla 16. Actividad acidificante y recuento de los mutantes fagorresistentes de *Leuconostoc*, luego de 24 h a 30 °C en LDR (leche descremada reconstituída, 10 % m/v).

Cepa sensible /Mutantes	Ácido láctico (%)	Acidez (°D)	pH (24 h)	Recuento inicial (UFC/ml)	Recuento final (UFC/ml)
R707	0,2	22,0	6,3	$2,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
R707 – 1	0,2	22,0	6,3	$2,0 \times 10^7$	$3,8 \times 10^8$
R707 – 2	0,2	22,0	6,3	$2,0 \times 10^7$	$4,1 \times 10^8$
D6a	0,9	88,2	4,8	$1,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$
D6a10	0,5	54,5	5,5	$1,0 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$
D6a13	0,6	55,7	5,5	$1,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^8$
D6a15	0,6	63,8	5,2	$1,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^8$
L79-1	0,8	83,5	5,4	$1,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$
L79-2	0,7	71,9	5,5	$1,0 \times 10^7$	$1,8 \times 10^9$
L79-16	0,7	70,8	5,5	$1,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^9$
COC 1	0,7	69,6	5,5	$1,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$
COC 2	0,8	81,2	5,5	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$
COC 3	0,7	69,6	5,5	$1,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$

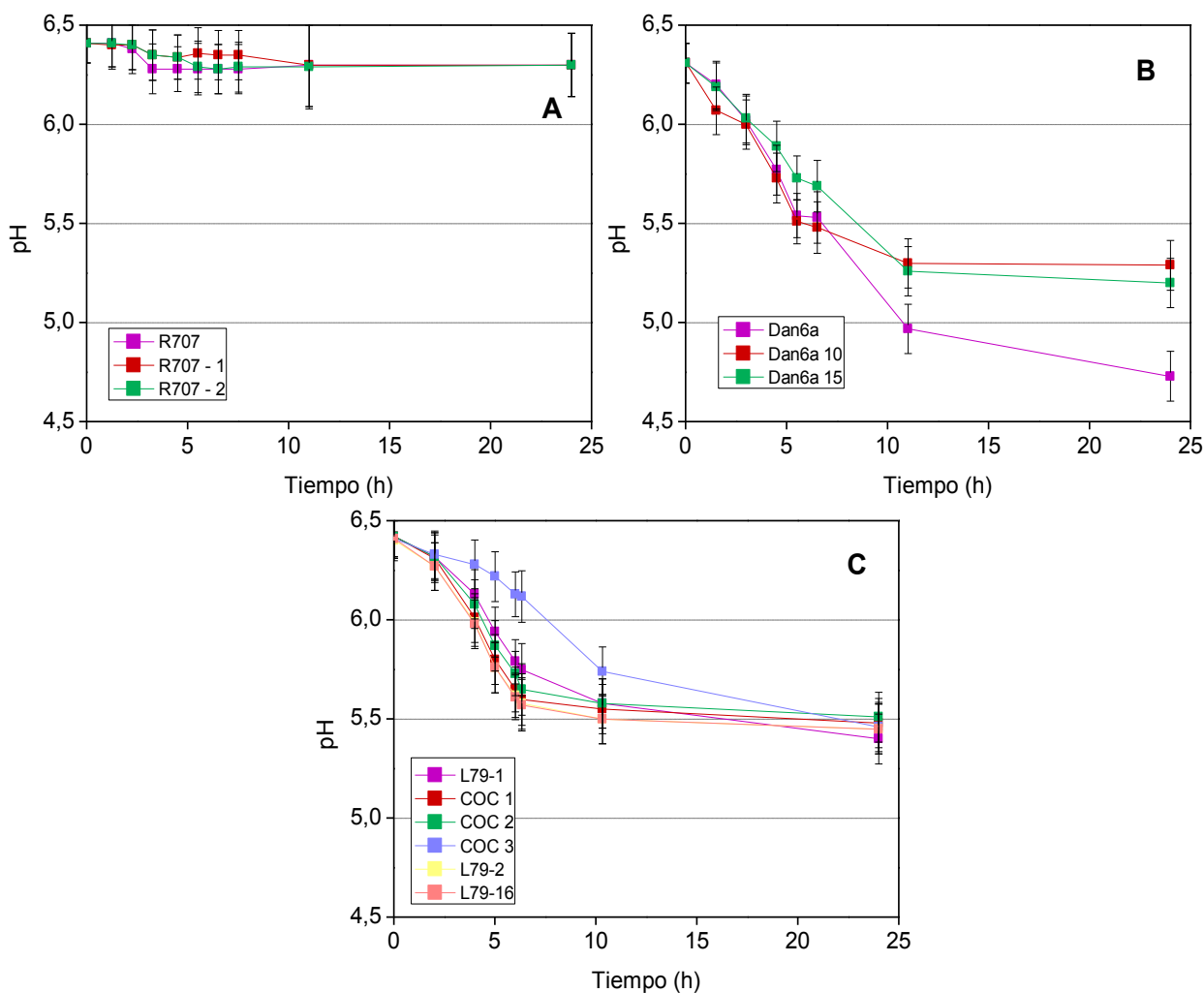


Figura 37. Cinéticas de acidificación en LDR (leche descremada reconstituída, 10 % m/v), a 30 °C, de *Leuc. pseudomesenteroides* R707 (A), *Leuc. mesenteroides* D6a (B) y *Leuc. mesenteroides* L79-1 (C) y sus respectivos mutantes fagorresistentes. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones \pm SD.

5. Estudio preliminar de sistemas CRISPR-Cas en BAL

5.1. Relevamiento de secuencias CRISPR en cepas de *Leuconostoc*

El resultado de la búsqueda reveló que, hasta el momento, existe una única cepa incluida en la base de datos (<http://crispr.u-psud.fr/crispr/>), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, cuyo cromosoma contiene una 'posible' secuencia CRISPR (no confirmada), pero sin genes *cas* asociados al sistema. Cuando se realizó la búsqueda en otras bases de datos *online* (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>, <https://www.ncbi.nlm.gov>), se observó que la cantidad de genomas de *Leuconostoc* secuenciados es muy escasa en comparación con la de otras bacterias ácido lácticas, siendo bajas las posibilidades de identificar estructuras CRISPR. Por esta razón, y debido a la insuficiente cantidad de secuencias disponibles, no fue posible realizar el alineamiento previsto de secuencias CRISPR y posterior diseño de *primers*.

5.2. Relevamiento y análisis bioinformático de secuencias CRISPR en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*

De acuerdo a las bases de datos *online* consultadas, se identificaron 16 cepas que exhiben, al menos, una secuencia CRISPR confirmada en su cromosoma, además de dos cepas conteniendo, solamente, estructuras cuestionables (Tabla 17). De las cepas con secuencias CRISPR confirmadas, una corresponde a *Lb. casei*, diez a *Lb. paracasei* y cinco a *Lb. rhamnosus*. Analizando dicha información, resulta que la secuencia repetitiva (repeticiones) para todas las cepas de *Lb. paracasei* fue 5'-GCTCTGAACTGATTGATTGCGACATCTACCTGAGAC-3', para *Lb. casei* 5'-GTTTTCCCCGCACATGCGGGGGTGATCC-3' y para *Lb. rhamnosus* 5'-GTTCTGAACTGATTGATCTGACATCTACCTGAGAC-3'. El número de repeticiones encontrado para las cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* analizadas fue variable (entre 1 y 46) (Tabla 17). Tanto para *Lb. paracasei* como para *Lb. rhamnosus*, las secuencias repetitivas tuvieron 36 pb, y fueron muy similares entre sí, con solo 2 bases diferentes (Figura 38A).

Todas las cepas que revelaron secuencias CRISPR en su genoma también presentaron genes *cas* que están asociados a las secuencias CRISPR, en tanto que todas aquellas que poseen solamente estructuras cuestionables, no presentaron genes *cas*. Para las cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* analizadas, los principales genes asociados a la secuencia CRISPR encontradas fueron *csn*, *cas1*, *cas2* y *cas9*. En particular, *Lb. casei* ATCC 334 posee 8 genes diferentes: un gen que codifica para la helicasa, seis genes asociados a CRISPR y un gen que codifica para la 3'-5' exonucleasa (Figura 38B).

Los genes *csn*, *cas1*, *cas2* y *cas9* presentes en las cepas de *Lb. paracasei*, revelaron secuencias muy conservadas cuando se compararon con la cepa *Lb. paracasei* BL23 (identidad superior al 90 %) (Tabla 17). Esta identidad resultó menor al 71 % cuando la comparación se realizó con los genes *cas* presentes en las cepas de *Lb. rhamnosus* analizadas, a excepción de la cepa *Lb. rhamnosus* Lc 705, que exhibió una identidad de 99 %. Por el contrario, cuando se compararon los genes *cas* de *Lb. paracasei* BL23 con aquellos presentes en la única cepa reportada de *Lb. casei* (ATCC 334) conteniendo secuencias CRISPR confirmadas, la identidad fue notablemente menor (40 %), debido a que ambas cepas poseen un conjunto diferente de genes *cas*.

Analizando las secuencias de los sistemas CRISPR-Cas presentes en *Lb. paracasei* BL23 (Figura 38B), *Lb. paracasei* W56, *Lb. paracasei* BD-II, *Lb. paracasei* LcA, *Lb. paracasei* LcY, *Lb. paracasei* ATCC 27139 y *Lb. paracasei* ATCC 27092, se identificaron dos genes que podrían codificar para dos transposasas. En el resto de cepas de *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* analizadas no se identificaron genes que codifiquen para transposasas dentro del sistema CRISPR-Cas.

Tabla 17. Relevamiento de estructuras CRISPR en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*.

Especie	Cepa	Secuencias CRISPR	Secuencia de repeticiones (5' - 3')	N° de repeticiones	Genes <i>cas</i>	Identidad (%) ^a
<i>Lb. casei</i>	ATCC 334	1 CRISPR, 2 estructuras cuestionables	GTTTTCCCCGCACATGCGGGGGTGATCC	20	helicasa asociada a CRISPR, 6 proteínas asociadas a CRISPR y 3'-5' exonucleasa	40%
	BD-II	1 CRISPR	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	21	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	99%
	L9	1 CRISPR, 2 estructuras cuestionables	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	46	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	90%
<i>Lb. paracasei</i>	LOCK919	1 CRISPR, 2 estructuras cuestionables	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	11	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	94%
	W56	1 CRISPR	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	21	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	99%
	BL23	1 CRISPR	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	21	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	100%
	LC2W	1 CRISPR	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	21	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	99%
	8700	1 CRISPR, 1 estructura cuestionable	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	20	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	94%
	Zhang	1 CRISPR, 1 estructura cuestionable	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	20	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	94%
	LcA	1 CRISPR	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	21	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	99%
	LcY	1 CRISPR	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	21	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	99%

^a: Identidad (%) de los genes *csn2, cas2, cas1* y *cas9*, de cada una de las cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*, en relación a la región que abarca los mismos genes en la cepa *Lb.*

paracasei BL23.

Tabla 17 (Continuación). Relevamiento de estructuras CRISPR en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*.

Especie	Cepa	Secuencias CRISPR	Secuencia de repeticiones (5' - 3')	N° de repeticiones	Genes <i>cas</i>	identidad (%) ^a
<i>Lb. rhamnosus</i>	Lc 705	1 CRISPR	GCTCTTGAAGTATTGATTTCGACATCTACCTGAGAC	21	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	99%
	ATCC 53103	1 CRISPRs, 2 estructuras cuestionables	GTTCTTGAAGTATTGATCTGACATCTACCTGAGAC	24	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	71%
	ATCC 8530	1 estructura cuestionable	GCGTGATGGCCGGTCTTTGGCCATTGCGCCAAGGTCCTTACA	1	No presenta	-
	BPL5	2 CRISPRs, 4 estructuras cuestionables	GTTCTTGAAGTATTGATCTGACATCTACCTGAGAC	17, 24	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	72%
	GG	2 CRISPRs, 2 estructuras cuestionables	GTTCTTGAAGTATTGATCTGACATCTACCTGAGAC	24, 24	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	73%
	LOCK900	1 CRISPR, 2 estructuras cuestionables	GTTCTTGAAGTATTGATCTGACATCTACCTGAGAC	28	<i>csn2, cas2, cas1, cas9</i>	73%
	LOCK908	1 estructura cuestionable	GCGTGATGGCCGGTCTTTGGCCATTGCGCCAAGGTCCTTACA	1	No presenta	-

^a: Identidad (%) de los genes *csn2, cas2, cas1* y *cas9*, de cada una de las cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*, en relación a la región que abarca los mismos genes en la cepa *Lb. paracasei* BL23.

```

Lb. rhamnosus GCTCTTGAAC TGATTGATTCGACATCTACCTGAGAC 36
                | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Lb. paracasei GTTCTTGAAC TGATTGATCTGACATCTACCTGAGAC 36
    
```

A



B

Figura 38. Alineamiento de (A) secuencia repetitiva identificada en los sistemas CRISPR-Cas de cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* (ClustalW) y (B) sistemas CRISPR-Cas de las cepas *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. paracasei* Zhang, *Lb. paracasei* BL23 y *Lb. casei* ATCC 334 (Geneious 9.0.2).

5.3. Determinación de las secuencias líder y PAM

Adyacente a cada agrupación de repeticiones-espaciadores existe una secuencia denominada “líder”, donde se localiza el promotor responsable de la transcripción de dicha agrupación en un ARN primario (pre-crARN) que abarca la totalidad de la misma. Dicha secuencia suele ser conservada entre distintas cepas de una misma especie o grupo. El análisis informático (Geneious 9.0.2) de las secuencias disponibles de cepas de *Lb. rhamnosus* y *Lb. paracasei*, determinó que la secuencia líder se encuentra entre el arreglo CRISPR y el gen *csn2*. A su vez, en base al alineamiento de dichas secuencias, se deduce que la secuencia líder para *Lb. rhamnosus* sería 5'-TTTGAGAGGTGCCAGTATATCTATATTGACAAAGATTTTCATG GATAGCCGTGAACTGATTGATTAAGAGACTGTGTGAAAACAC-3', mientras que para *Lb. paracasei* sería 5'-TTTGAGAAATGCCAGTATATCTATATTGACGAGGACTTCGTTGACAATCGCGAA CTAGATTGATTAGGAGATTGTGTGAAAACAC-3', siendo la similitud entre dichas secuencias de 84 %.

La secuencia PAM, deducida a partir del alineamiento de las regiones adyacentes a los protoespaciadores detallados en la Tabla 18, resultó ser: 5'-NGAA-3' o 3'-TTCN-5' (Figura 39). También se observó que si se alinean los protoespaciadores con los espaciadores que se encuentran en el arreglo CRISPR, las orientaciones de las secuencias PAM y líder son inversas.

Tabla 18. Protoespaciadores deducidos a partir del análisis de los sistemas CRISPR-Cas de las cepas de *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. rhamnosus* ATCC 53103.

N ^o a	Espaciador presente en <i>Lb. rhamnosus</i> GG (5'-3')	Tamaño (pb)	Fago	Protoespaciador presente en el fago (5'-3')
4	TGAAATAATTGTTGACACGTGAGAACACAG	30	Lc-Nu	TGAAATAATTGTTGACACATGGGAACAC
4	TGAAATAATTGTTGACACGTGAGAACACAG	30	Lrm1	TGAAATAATCGTTGACACATGGGAACAC
4	TGAAATAATTGTTGACACGTGAGAACACAG	30	A2	TGAAATAATCGTTGACACATGGGAACAC
6	TTAGTGGCAGAGAGGTAATGATGATCACAC	30	Lc-Nu	TTAGCGGCAAAGAGGTAATGAGGATCACAC
9	GTCTAGCCCGAGAAGTTCCGCGGCTTTTT	30	A2	GTCTAGTCCAAGAAGTTCCGCGGCTTTT
12	CGCAGTCTTGCAAGCCGTAATGCTCGATCT	30	Lca1	CGCAGTCTTGCAAGCCGTAATGCTCGAT
12	CGCAGTCTTGCAAGCCGTAATGCTCGATCT	30	φ AT3	CGCAGTCTTGCAATCCGTAATGCTCGATCT
12	CGCAGTCTTGCAAGCCGTAATGCTCGATCT	30	A2	CGCAGTCTTGCAAGCCGTAATGCTCGAT
18	TAGTGATCATATTCATGCAACACAAACGGT	30	Lc-Nu	TAGTGATCAGATTCATGCAACACAAACGGT
18	TAGTGATCATATTCATGCAACACAAACGGT	30	φ AT3	TAGTGATCAGATTCATGCAACACAAACGGT
21	GGTGGCATCACAGAAGCAACCGAAACAATC	30	Lrm1	GGTGGTATCACAGAAGCAACCGAAACAATC
21	GGTGGCATCACAGAAGCAACCGAAACAATC	30	A2	GGTGGTATCACAGAAGCAACCGAAACAATC
22	AAGTGGTAAGGTCCCCAAAGATTCGATGAT	30	Lrm1	AAGTGGTAAGGTCCCCAAAGATTCGATGAT
22	AAGTGGTAAGGTCCCCAAAGATTCGATGAT	30	PL-1	AAGTGGTAAGGTCCCCAAAGACTCGATGAT
22	AAGTGGTAAGGTCCCCAAAGATTCGATGAT	30	A2	AAGTGGTAAGGTCCCCAAAGATTCGAT
24	AAGCAATCCAGAACTCGGGATCGTTTCTT	30	A2	AAGCAATCCAGAACTCGGGATCGTTTCTT
N ^o a	Espaciador presente en <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103 (5'-3')	Tamaño (pb)	Fago	Protoespaciador presente en el fago (5'-3')
6	GCATATAGCTTGATATTGGCCGCAAGCTCG	30	PL-1	GCATATAGCTTGATATTGGCCGCAAGCTCGTCT
6	GCATATAGCTTGATATTGGCCGCAAGCTCG	30	J-1	GCATATAGCTTGATATTGGCCGCAAGCTCGTCT
12	TCTCGAGTCTTGCAAGCCGTAATGCTCGA	30	A2	TCTCGAGTCTTGCAAGCCGTAATGCTCGAT

^a Ubicación del espaciador dentro del arreglo CRISPR.

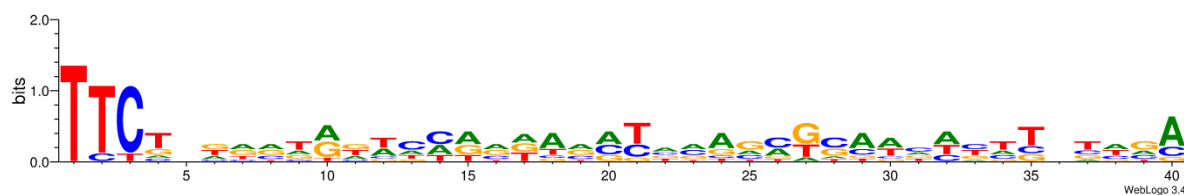


Figura 39. Secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) obtenida utilizando el programa WebLogo (versión 3.4).

5.4. Relevamiento de cepas de la colección del INLAIN que contienen el sistema CRISPR-Cas en su ADN cromosómico

Con el objetivo de investigar la presencia de sistemas CRISPR-Cas, se analizaron 37 cepas pertenecientes a la colección del INLAIN, mediante la amplificación con *primers* específicos diseñados sobre secuencias CRISPR conocidas y sobre genes asociados. De acuerdo a los resultados (Tabla 19), se observó amplificación del arreglo CRISPR para 18 de las cepas estudiadas. En particular, para 15 cepas se obtuvo un amplicón de 2000 pb. Por otro lado, para *Lb. paracasei* Jp-1, *Lb. paracasei* 84 y *Lb. paracasei* 85, se observaron amplificaciones del arreglo CRISPR con amplicones de 1200, 800 y 700 pb, respectivamente. Todas las cepas que amplificaron el arreglo CRISPR también amplificaron el gen *cas1*, obteniéndose un amplicón del tamaño esperado (900 pb). A su vez, *Lb. paracasei* 88 no mostró amplificación del arreglo CRISPR con los *primers* ensayados, aunque resultó positiva para el gen *cas1*, lo que sería un indicio de que posee una estructura CRISPR en su cromosoma, si bien sería diferente a las anteriores. Por otro lado, 23 de las cepas de *Lb. paracasei* estudiadas amplificaron la región que comprende el arreglo CRISPR, genes *cas1* y *cas2* (Tabla 19); aunque no fue posible establecer con exactitud el tamaño de los amplicones, que fue variable entre 2000 y 5000 pb (datos no mostrados). No se obtuvieron amplicones para el resto de las cepas; sin embargo, no se descarta que posean sistemas CRISPR en su cromosoma.

Es interesante resaltar que 9 de las 15 cepas que amplificaron el arreglo CRISPR con un tamaño de 2000 pb, resultaron ser sensibles a algunos de los fagos líticos de *Lb. paracasei* pertenecientes a la colección del INLAIN.

Tabla 19. Resultados obtenidos durante el relevamiento de sistemas CRISPR-Cas en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* pertenecientes a la colección del INLAIN.

Especie	Cepa	Amplificación de sistemas CRISPR-Cas		
		Arreglo CRISPR (pb)	Gen <i>cas1</i> (pb)	Arreglo CRISPR, genes <i>cas1</i> y <i>cas2</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393	-	-	-
	CNRZ 1874	-	-	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	092ch1	2000	900	+
	092ch3	2000	900	+
	092g3	2000	900	+
	139ch2	2000	900	+
	139g1	2000	900	+
	139g2	2000	900	+
	72	-	-	+
	81	-	-	-
	84	800	900	+
	85	700	900	+
	86	-	-	-
	88	-	900	+
	A*	2000	900	+
	A13*	2000	900	+
	A14*	2000	900	+
	ATCC 25302	-	-	-
	ATCC 27092*	2000	900	+
	ATCC 27139*	2000	900	+
	Bio	-	-	-
	CNRZ 1308	-	-	-
	CNRZ 1976	-	-	-
	CNRZ 318	-	-	-
	Dn*	2000	900	+
	Hn*	2000	900	+
	BL23*	2000	900	+
	Jp-1	1200	900	+
L26	-	-	+	
SA	-	-	+	
Yk*	2000	900	+	

(+) amplificación positiva; (-) amplificación negativa; *cepas sensibles a fagos líticos de *Lb. paracasei* pertenecientes a la colección del INLAIN.

Tabla 19 (Continuación). Resultados obtenidos durante el relevamiento de sistemas CRISPR-Cas en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*, pertenecientes a la colección del INLAIN.

Especie	Cepa	Amplificación de sistemas CRISPR-Cas		
		Arreglo CRISPR (pb)	Gen <i>cas1</i> (pb)	Arreglo CRISPR, genes <i>cas1</i> y <i>cas2</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	-	-	-
	CNRZ 1224	-	-	-
	INL1	-	-	-
	INL2	-	-	-
	PR	-	-	-
	90	-	-	-

(+) amplificación positiva; (-) amplificación negativa; *cepas sensibles a fagos líticos de *Lb. paracasei* pertenecientes a la colección del INLAIN.

5.5. Obtención de derivados fagorresistentes a partir de cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*

En la Tabla 20, se muestran los resultados obtenidos durante el aislamiento de derivados fagorresistentes a partir de las cepas BL23, A13, A14, A, ATCC 27092, Yk y ATCC 27139, todas pertenecientes a *Lb. paracasei*, utilizando los fagos C_L1, iLp84 e iLp1308 (Mercanti y col., 2015), PL-1 (Capra y col., 2011), MLC-A (Capra y col., 2006a), individualmente y formando un cóctel. El desarrollo de las variantes fagorresistentes se observó entre las 72 y las 120 h posteriores a la infección fágica. Luego, se realizó la extracción de ADN total bacteriano de los derivados que desarrollaron adecuadamente, y de las cepas sensibles a fagos de las cuales fueron aislados, para ser sometidas a amplificaciones por PCR. La adquisición de nuevos espaciadores (presencia de inserto) entre la región líder y la primera repetición del sistema CRISPR-Cas, se visualizó mediante la aparición de una nueva banda de 260 pb. De acuerdo a los resultados obtenidos, para *Lb. paracasei* BL23 y *Lb. paracasei* A cuando fueron infectadas con el fago MLC-A, se observaron dos bandas, la primera de 200 pb y la segunda de 260 pb. Para el resto de las cepas analizadas, se observó una única banda de 200 pb (datos no mostrados). Debido a que las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de ADN obtenido de un cóctel de derivados

resistentes, se intentó aislar (mediante estriados en medios agarizados) los derivados que contenían solamente una banda de 260 pb, pero la baja proporción de clones con inserto, no permitió dicha recuperación.

Tabla 20. Obtención de derivados fagorresistentes a partir de diversas cepas de *Lb. paracasei*.

Fagos	Cepas de <i>Lactobacillus paracasei</i>						
	BL23	A13	A14	A	ATCC 27092	Yk	ATCC 27139
C _L 1				+			
iLp84	+	+	+	+	+	+	+
iLp1308			+	+			
PL-1			+	+			
MLC-A	+		+	+			

(+) desarrollo de variantes fagorresistentes.

5.6. Aislamiento de derivados de *Lactobacillus paracasei* BL23 con el sistema CRISPR-Cas activo.

Con el objetivo de aislar derivados de *Lb. paracasei* BL23 con el sistema CRISPR-Cas activo, se realizó la amplificación del arreglo CRISPR a partir de *Lb. rhamnosus* GG y, posteriormente, dicho amplicón se insertó en el plásmido pEM76. En la Figura 40A, se observa el amplicón correspondiente al arreglo CRISPR de *Lb. rhamnosus*, digerido con las enzimas EcoRI y BamHI, concentrado y purificado. En la Figura 40B, se observa el plásmido pEM76 cortado con las mismas enzimas, antes de ser purificado. Luego de cortar y purificar el producto de PCR y el plásmido, se realizó la ligación y transformación de *Escherichia coli* top 10. La eficiencia de transformación obtenida, calculada como número de transformantes/g de plásmido (ADN), fue de aproximadamente 10^7 transformantes/g ADN. Los clones transformados, que desarrollaron en presencia de antibiótico, fueron testeados por PCR, de manera de seleccionar aquellos que contenían plásmido e inserto. Aquellos plásmidos para los que se confirmó la presencia de inserto, fueron sometidos a secuenciación. Las secuencias obtenidas revelaron 99 % de identidad con el arreglo CRISPR

de *Lb. rhamnosus* GG, hecho que confirmó la presencia de dicho inserto en el plásmido. Los plásmidos conteniendo el inserto fueron purificados y, finalmente, congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

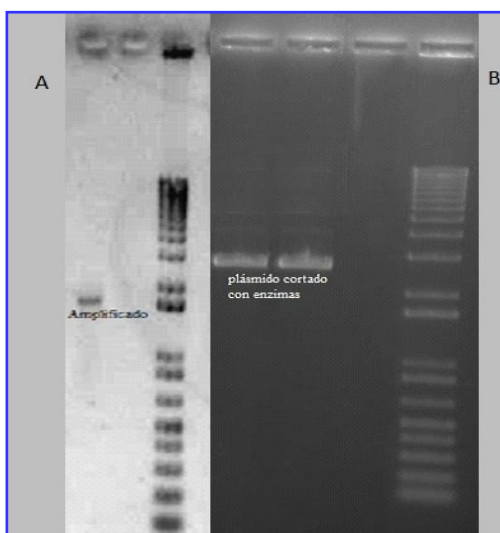


Figura 40. (A) Amplicón correspondiente al arreglo CRISPR de *Lb. rhamnosus* GG, digerido con las enzimas EcoRI y BamHI. (B) Plásmido pEM76 digerido con las enzimas EcoRI y BamHI.

Durante la próxima etapa de estudio, y utilizando el plásmido pEM76 conteniendo el inserto, se transformará la cepa *Lactobacillus paracasei* BL23 con el propósito de aislar derivados con el sistema CRISPR-Cas activo. Esta actividad, iniciada durante una estadía en la Universidad de Alicante, España (abr-oct/2015, Programa BEC.AR, Estadías Cortas de Doctorado en Ciencia y Tecnología para Profesionales Argentinos en el Reino de España), continuará llevándose a cabo en el INLAIN en el marco de una Beca Posdoctoral solicitada a CONICET (Convocatoria ago/2016).

A circular, grayscale microscopic image of biological cells, likely showing various types of microorganisms or cells with distinct structures and textures. The word "DISCUSIÓN" is overlaid in the center in a bold, black, sans-serif font.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La industria láctea fermentativa es vulnerable a las infecciones fágicas, representando una constante amenaza debido a que pueden generar grandes pérdidas económicas. Por muchos años se ha intentado encontrar estrategias para minimizar el ataque fágico de manera de evitar que interfieran con la elaboración de los productos lácteos fermentados (Moineau y Lévesque, 2005; Carminati y col., 2016). Como puede suponerse, el género *Leuconostoc* no escapa a la problemática de las infecciones fágicas. En general, las cepas pertenecientes a este género desarrollan pobremente en leche y, en consecuencia, poseen escasa capacidad acidificante. Por este motivo, y debido a que suelen utilizarse en cultivos iniciadores mixtos junto con *Lactococcus*, en nuestro país no existen datos reportados acerca de episodios que involucren fagos de *Leuconostoc*, ya que el problema podría haber pasado desapercibido o haber sido adjudicado a otros factores. Sin embargo, durante un monitoreo realizado por nuestro grupo en una planta quesera local, fue posible detectar la existencia de fagos de *Leuconostoc*, capaces de atacar cepas que forman parte del fermento utilizado para procesos de elaboración de ciertos quesos (Pujato y col., 2014a, 2015).

En este trabajo se estudiaron fagos específicos de *Leuconostoc* y sus respectivas cepas indicadoras. Las cepas sensibles a fagos fueron aisladas a partir de los fermentos comerciales utilizados para la elaboración de queso azul en una planta quesera local, mientras que los fagos infectivos se aislaron del suero de quesería de esas elaboraciones.

Las cepas comerciales sensibles a fagos se identificaron a nivel molecular mediante amplificación de la región 16S del ADNr. Sin embargo, para el género *Leuconostoc*, la correcta identificación molecular a nivel de especies es compleja y limitada. A pesar de que la secuenciación de la región 16S del ADNr es una metodología altamente confiable, el gen 16S es muy conservado en *Leuconostoc*, por lo que en ciertas ocasiones no permite la discriminación entre especies (Mendonça Moraes y col., 2013). Esto se debe, en parte, a la escasa cantidad de genomas completos de *Leuconostoc* disponibles en bases de datos *online*. De acuerdo a estudios previos, las pruebas bioquímicas y fisiológicas para identificar especies y subespecies de *Leuconostoc* son escasas (Cibik y col., 2000; Cardamone y col., 2011), y el uso de técnicas tradicionales, como patrones de fermentación de azúcares, comúnmente conduce a errores de

identificación entre el género *Leuconostoc* y otras bacterias estrechamente relacionadas, tales como *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella* (Kulwichit y col., 2007). En la presente Tesis, se utilizó la secuenciación del gen 16S como metodología molecular de identificación a nivel de especie de las cepas de *Leuconostoc* usadas en este trabajo. En base a esta identificación las cepas fueron clasificadas como *Leuconostoc mesenteroides* (C19A, C19B, CyC, D4, D4b, D6a y L79-1) y *Leuc. pseudomesenteroides* (R707).

La diversidad genética de las cepas de *Leuconostoc* sensibles a fagos se analizó mediante perfiles RAPD-PCR. De acuerdo a los mismos, se observó una similitud >60 % entre las cepas identificadas como *Leuconostoc mesenteroides*, y un perfil claramente distintivo para la cepa clasificada como *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Las cepas utilizadas fueron aisladas a partir de diferentes fermentos comerciales y en distintos momentos; sin embargo, la baja diversidad podría deberse a la existencia de un número limitado de cepas comerciales de *Leuconostoc* que poseen los fenotipos industriales apropiados para la fabricación de quesos de pasta azul con una óptima producción de CO₂ (Hemme, 2012).

Los perfiles de restricción obtenidos a partir de los 9 genomas fágicos analizados, permitieron clasificarlos en seis *clusters*. Se seleccionó un fago de cada *cluster* para posterior secuenciación y análisis del genoma. Los tamaños de los genomas de los fagos secuenciados (LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9) fueron similares a aquellos previamente reportados para fagos líticos de *Leuconostoc* (26 kb a 29 kb) (Lu y col., 2010; Kleppen y col., 2012; Kot y col., 2014), pero menores al del fago temperado ϕ MH1 (38,7 kb) (Jang y col., 2010). El contenido de GC para todos los fagos fue similar a lo reportado para cepas de *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (37 %) y para otros fagos de *Leuconostoc* (Lu y col., 2010; Kleppen y col., 2012; Kot y col., 2014). Teniendo en cuenta el mecanismo de empaquetamiento del material genético, los fagos pueden clasificarse en *cos* o *pac*. El análisis de la secuencia genómica de los fagos de *Leuconostoc* estudiados, permitió demostrar que todos ellos presentaron mecanismo de tipo *cos*. La presencia de un sitio *cos* indica que estos fagos pueden ser recircularizados en el interior de la cepa hospedadora. Las secuencias *cos* (formadas por 22 nucleótidos) de los fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9, fueron similares a aquellas encontradas en el fago 1-A4 (Lu y col., 2010), mientras que las secuencias *cos* de los fagos Φ LN25, Φ LN34, Φ LNTR2 y Φ LNTR3 (Kot y

col., 2014) fueron similares pero más cortas (12 nucleótidos). La secuencia *cos* hallada en el fago LDG está compuesta por 23 nucleótidos, y es similar a aquella encontrada en el fago el Lmd1 (Kleppen y col., 2012), específico de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* A1.

De acuerdo al grado de similitud genómica, los fagos secuenciados se dividieron en dos Grupos (1 y 2). Los genomas fágicos del Grupo 1 (formado por los fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9) mostraron una identidad mayor al 90 % con los fagos Φ LN25, Φ LN34, Φ LNTR2 y Φ LNTR3 (Kot y col., 2014) y 1-A4 (Lu y col., 2010), infectivos de cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Por otro lado, el genoma del fago LDG, perteneciente al Grupo 2, mostró 90 % de identidad con los fagos Φ LN03, Φ LN04, Φ LN12, Φ LN6B y P793 (Kot y col., 2014), infectivos de cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, y 82 % de identidad con el genoma del fago Lmd1 (Kleppen y col., 2012), específico de una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Los genomas de los fagos de ambos grupos presentaron cinco módulos funcionales altamente conservados: replicación, empaquetamiento, morfogénesis, lisis celular y regulación génica. La composición de dichos módulos y el ordenamiento de sus genes fueron muy similares entre ambos grupos y, a su vez, similares a los de otros fagos líticos de *Leuconostoc* previamente reportados (Lu y col., 2010; Kleppen y col., 2012; Kot y col., 2014). Por el contrario, el genoma del fago temperado Φ MH1 (Jang y col., 2010), a pesar de estar dividido en cinco módulos, mostró poca similitud con los fagos líticos de *Leuconostoc*. En este caso, sólo el gen que codifica para la ADN metiltransferasa presentó una similitud de 65 % con el ORF28 deducido del fago LDG. Las ADN metiltransferasas codificadas en el genoma fágico participan en el mecanismo de defensa frente a los sistemas de restricción/modificación utilizados por las bacterias (Labrie y col., 2010).

Dentro del módulo de morfogénesis se identificó un gen que codificaría para la proteína de unión al receptor (RBP). Dicha proteína se une de manera específica al receptor fágico presente en la superficie bacteriana e inicia el proceso de infección (Wang y col., 2000). La información existente acerca de las proteínas RBP en fagos que infectan bacterias Gram positivas es escasa en comparación con aquella disponible para fagos que infectan bacterias Gram negativas, aunque fue posible identificar un pequeño número de RBP en fagos de BAL (Mahony y col., 2013).

El análisis (Blastp) de los ORFs que codifican para las RBP de los fagos de *Leuconostoc* secuenciados, evidenció similitudes con las RBP reportadas anteriormente para otros fagos de *Leuconostoc*. De acuerdo a este análisis, los ORFs codificantes para RBPs se dividieron en dos fragmentos, siendo el primer fragmento (fracción N-terminal) altamente conservado entre fagos infectivos de cepas pertenecientes a la misma especie de *Leuconostoc* (80 a 100 % de identidad de aminoácidos), y el segundo (fracción C-terminal) variable entre aquéllas. De manera similar, los fagos DT1 y MD4 de *Streptococcus thermophilus* (Duplessis y Moineau, 2001), así como fagos de *Lactococcus lactis* (Dupont y col., 2004), presentaron un fragmento N-terminal conservado y una región C-terminal variable. Según estudios realizados por Dupont y col. (2004), la fracción C-terminal desempeñaría un papel muy relevante en la especificidad del reconocimiento del receptor presente en la superficie bacteriana.

La correlación entre la fracción variable de las RBPs y el espectro de hospedadores, permitió agrupar a los fagos en cuatro *clusters* diferentes. Los fagos CHA y CHB, cuya fracción variable de las RBPs fue similar, mostraron idéntico espectro de hospedadores. Por otro lado, los fagos Ln-7 y Ln-8, con fracción variable de las RBPs idéntica, compartieron también el espectro de hospedadores. A su vez, el fago Ln-9 presentó una fracción variable de la RBP diferente a la del resto de los fagos, evidenciando un perfil de hospedadores distinto. Por último, la fracción variable de la RBP del fago LDG fue la más divergente, mostrando 51 % y 10 % de similitud con la correspondiente fracción variable de los fagos P793 y Φ LN04, respectivamente (Kot y col., 2013). Dicho fago reveló un perfil de hospedadores diferente al del resto de los fagos estudiados. Respecto de la infectividad, cabe resaltar que todos los fagos analizados fueron capaces de lisar, aunque con diferente eficiencia, a todas las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* y a la cepa de *Leuc. pseudomesenteroides*. Estos resultados difieren de los publicados previamente por Kot y col. (2014), quienes informaron la presencia de dos grupos de fagos cuyo espectro de hospedadores no se solapaba, ya que un grupo (Φ LN25, Φ LN34, Φ LNTR2 y Φ LNTR3) lisaba exclusivamente cepas de *Leuc. mesenteroides*, mientras que el otro grupo de fagos (Φ LN03, Φ LN04, Φ LN12, P793 y Φ LN6B) solamente lisó cepas de *Leuc. pseudomesenteroides*. Según el presente estudio, la identificación de la fracción variable de las RBPs permitiría predecir el patrón de comportamiento de un fago de *Leuconostoc* frente a las

diversas cepas hospedadoras ensayadas. Similares resultados fueron observados por Mahony y col. (2013) en fagos de *Lactococcus*.

Como parte de la caracterización molecular, se realizó la identificación de las proteínas estructurales presentes en el fago Ln-8 mediante LC-MS/MS y SDS-PAGE. En términos generales, los tamaños de las proteínas encontradas fueron similares a los reportados para otros fagos de *Leuconostoc* (Lu y col., 2010; Kot y col., 2014). En el gel SDS-PAGE fue posible identificar seis bandas, que correspondieron a proteína *tape tail measure*, proteína estructural del cuello, proteína portal, proteína mayor de la cápside, proteína de unión al receptor y proteína mayor de la cola. La banda de mayor peso molecular correspondió a la proteína *tail tape measure*, cuyo tamaño calculado por LC-MS/MS fue de 87 kDa, y de aproximadamente 75 kDa de acuerdo con el patrón de migración en el gel de SDS-PAGE. Esto puede sugerir que dicha proteína está siendo procesada antes de su incorporación en la partícula fágica. En estudios previos se registró el clivaje proteolítico de la porción C-terminal de la proteína *tape tail measure* del fago Tuc2009 de *Lactococcus* (Mc Grath y col., 2006).

Morfológicamente, todos los fagos en estudio pertenecen a la familia *Siphoviridae* (Ackermann, 2009), al igual que la mayoría de los fagos que infectan cepas de *Leuc. mesenteroides* y *Leuc. pseudomesenteroides* (Lu y col., 2010; Kleppen y col., 2012; Ali y col., 2013). Las micrografías electrónicas evidenciaron cápsides icosaédricas y colas no contráctiles.

Los fagos de *Leuconostoc* estudiados en esta Tesis mostraron elevada viabilidad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo moderada a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y baja a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 10 meses de monitoreo. Similares resultados fueron observados para fagos de *Lactococcus* (Jończyk y col., 2011), *Lb. casei* y *Lb. paracasei* (Capra y col., 2006b; Mercanti y col., 2012), aunque, a diferencia de los fagos de *Leuconostoc*, dichos fagos presentaron elevada viabilidad a temperaturas de refrigeración ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$). En general, los fagos pertenecientes al orden *Caudoviriales* son resistentes a las bajas temperaturas (Ackermann y col., 2004), y para largos períodos de almacenamiento se recomienda la conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el agregado de un crioprotector (15 % de glicerol). Sin embargo, cuando los tiempos de almacenamiento son menores a los 2 meses, es aconsejable la refrigeración a temperaturas entre $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar la posible pérdida de viabilidad provocada por el estrés del congelamiento y descongelamiento (Jończyk y col., 2011).

Los estudios de viabilidad fágica incluyeron la evaluación de su infectividad luego de la incubación en suspensiones ajustadas a diferentes valores de pH. Los fagos de *Leuconostoc* exhibieron alta infectividad aún a valores extremos de pH, cercanos a 4 y 11. La viabilidad fágica fue afectada solamente a valores de pH muy bajos (pH 2 y 3), inactivándose completamente luego de 30 min de incubación a pH 2. El mismo comportamiento fue observado en un estudio realizado por Davis y col. (1985) sobre fagos de *Leuconostoc oenos*. Dichos fagos, presentes en vino, mostraron disminución de la viabilidad cuando el pH del vino fue inferior a 3,5. De forma similar, ciertos fagos de *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* y *Lb. paracasei* revelaron elevada resistencia en un amplio rango de pH (Auaud y col., 1997; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006a, 2006b).

Una de las estrategias industriales para mantener la concentración de partículas fágicas por debajo de los niveles críticos es la aplicación de tratamientos térmicos y químicos. En esta Tesis se estudió el efecto de diversos tratamientos térmicos sobre la viabilidad de los fagos de *Leuconostoc*, utilizando diferentes medios de suspensión. Además, se evaluó la resistencia de estos fagos frente a tratamientos con diversos biocidas utilizados en el laboratorio y en la industria.

Los fagos de *Leuconostoc* estudiados, mostraron elevada resistencia a 63 °C y a 72 °C, no siendo posible la inactivación completa de las partículas fágicas durante los 45 min de incubación. Sólo el fago CyC1 fue completamente inactivado luego de 5 min de tratamiento a 72 °C. Atamer y col. (2011) evaluaron la resistencia térmica de 77 fagos de *Leuconostoc*, observando que aproximadamente el 98 % de los mismos sobrevivió después de un minuto a 75 °C. De manera similar, muchos fagos que infectan BAL presentaron una elevada resistencia térmica cuando fueron sometidos a temperaturas de entre 63 °C y 72 °C (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). Este hecho sugiere que los tratamientos de pasteurización LTLT (*Low Temperature Long Time*) (63 °C por 30 min) y HTST (*High Temperature Short Time*) (72 °C por 15 s), aplicados a leche utilizada en la elaboración de quesos, no son efectivos para lograr la completa inactivación de las partículas fágicas que pudieran estar presentes en la materia prima. Como consecuencia, elevadas

concentraciones de fagos permanecerían en la leche, generando retraso o inhibición del proceso de fermentación de los cultivos *starters* y conduciendo a la obtención de productos defectuosos. En este trabajo, los fagos que presentaron mayor resistencia a 72 °C, se sometieron a un tratamiento a 80 °C, usando LDR como medio de suspensión. A esta temperatura, se observó inactivación completa de las partículas virales luego de 15-30 min de incubación. Un comportamiento similar fue observado por Atamer y col. (2011), en cuyo estudio el 70 % de fagos de *Leuconostoc* estudiados sobrevivió a un tratamiento de 1 min a 80 °C (Atamer y col., 2011). Estos resultados demuestran que los fagos de *Leuconostoc* presentan elevada resistencia frente a tratamientos térmicos. Más aún, la completa inactivación de todos los fagos estudiados en esta Tesis, solamente se logró luego de someterlos a 90 °C durante 2 min. Estudios realizados por Atamer y col. (2011), revelaron que tres fagos de *Leuconostoc* mantuvieron cierto nivel de infectividad luego de 1 min a 85 °C. Para fagos de otras especies de BAL se observó una inactivación completa luego de calentar a 90 °C (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Quiberoni y col., 2003; Capra y col., 2004; Burzul y col., 2007; Mercanti y col., 2012). Casos especiales de elevada termorresistencia son el fago Ib₃ (*Lb. delbrueckii*) cuya inactivación en LDR solamente se logró luego de 15 min a 90 °C (Quiberoni y col., 2003) y algunos fagos de *Lactococcus*, que fueron infectivos aún después de 5 min a 97 °C (Burzul y col., 2007; Atamer y col., 2009). Algunos de estos tratamientos tan severos podrían ser aplicados 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 estas condiciones convierten a la leche en una matriz no apta para la caseificación, provocando otros inconvenientes como la desnaturalización de las proteínas del suero y la consiguiente disminución del rendimiento.

Si bien el medio de suspensión no afectó, en general, la resistencia térmica de los fagos de *Leuconostoc* en estudio, se observó un incremento de la termorresistencia del fago LDG cuando se usó leche como medio de suspensión. Atamer y col. (2011) observaron un efecto protector de la leche sobre algunos de los fagos de *Leuconostoc* estudiados. De acuerdo a sus resultados, 5 fagos de *Leuc. pseudomesenteroides* presentaron una mayor resistencia frente a los tratamientos térmicos cuando utilizaron leche como medio de suspensión. Este efecto

protector fue también evidenciado para fagos de *Lactococcus* (Atamer y col., 2010) y de *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2003; Ebrecht y col., 2010). Algunos autores sugieren que ciertos componentes de la leche, especialmente la caseína, podrían ser responsables del incremento de la resistencia térmica de las partículas virales (Atamer y col., 2010). Otros componentes de la leche como las proteínas del suero (Daoust y col., 1965) y los glóbulos grasos (de Fabrizio y col., 1999) también podrían ejercer un efecto protector de los fagos durante la aplicación de los tratamientos térmicos. Sin embargo, el efecto protector de la leche no fue verificado en todos los casos. Suárez y Reinheimer (2002) reportaron que el *buffer* fosfato era el que ejercía mayor protección, mientras que Capra y col. (2004) observaron que el medio de suspensión no generó ningún efecto protector en fagos de *Lb. paracasei*.

Con respecto a la resistencia de los fagos frente a agentes químicos (biocidas) comúnmente utilizados en ambientes industriales y laboratorios, el ácido peracético (0,15 % v/v) fue uno de los más eficientes. Este biocida logró la completa inactivación de los fagos de *Leuconostoc* luego de 2 min a 25 °C. La alta eficiencia de este biocida podría ser debida al pH que posee en solución (pH 2), ya que los controles de viabilidad a ese pH demostraron completa inactivación de las partículas fágicas. Estos mismos resultados fueron observados para fagos de otras especies de bacterias lácticas (Binetti y Reinheimer, 2000; Capra y col., 2004, 2006b; Briggiler Marcó y col., 2009; Ebrecht y col., 2010; Mercanti y col., 2012).

Una elevada sensibilidad al etanol al 75 % (v/v) fue observada para la mayoría de los fagos de *Leuconostoc* estudiados. En general, se inactivó completamente la mayoría de los viriones cuando se incubaron en soluciones de etanol al 75 % (v/v) durante 15 a 30 min. Según los datos publicados, 75 % (v/v) es la concentración de etanol más eficaz para inactivar fagos de bacterias lácticas, en particular aquellos infectivos de *Lc. lactis* (Suárez y Reinheimer, 2002; Buzrul y col., 2007), *St. thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2003; Ebrecht y col., 2010) y *Lb. helveticus* (Quiberoni y col., 1999). Por el contrario, los tratamientos con etanol al 50 % (v/v) y al 100 % (v/v) fueron menos efectivos para la mayoría de los fagos de *Leuconostoc* en estudio.

La eficiencia del hipoclorito de sodio para inactivar las partículas virales de *Leuconostoc* fue variable. Fueron necesarias concentraciones de 400 y 800 ppm de cloro activo para lograr la

inactivación completa de los fagos CHB y CyC1, respectivamente. La resistencia del fago CHA frente al hipoclorito de sodio fue elevada, ya que fueron necesarias 1000 ppm de cloro activo para su inactivación completa luego de 30 min de incubación. Por otro lado, los fagos LDG, Ln-7 y Ln-8 presentaron una resistencia extremadamente elevada frente a este biocida, ya que solamente concentraciones de 1400 (fago LDG) y 1600 ppm (fagos Ln-7 y Ln-8) de cloro activo provocaron la inactivación total de las suspensiones fágicas luego de 45 min de incubación. De todos modos, las concentraciones de hipoclorito de sodio necesarias para alcanzar la inactivación completa de los fagos son mucho mayores a las permitidas en la industria de alimentos (200 ppm), potenciando además, la corrosión del material metálico de los equipos de la planta. Por lo tanto, no es posible el uso de este biocida en concentraciones que aseguren la inactivación fágica en ambientes industriales pero sí en laboratorios (Briggiler Marcó y col., 2009). Estudios realizados en fagos que atacan BAL reportaron que dichos fagos generalmente son inactivados por concentraciones menores a 300 ppm de hipoclorito de sodio (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Ebrecht y col., 2010). Sin embargo, un estudio realizado por Quiberoni y col. (2003) reveló que se necesitaron 1200 ppm de cloro activo para inactivar al fago Ib₃, infectivo de *Lb. delbrueckii*. La elevada resistencia frente al hipoclorito de sodio, presentada por ese fago, es comparable a la obtenida para los fagos de *Leuconostoc* LDG, Ln-7 y Ln-8.

Además de los biocidas ya mencionados, existen otros agentes químicos que se utilizan en la industria láctea para la limpieza y el saneamiento del ambiente industrial. Sin embargo, sólo se han reportado estudios para fagos de *Lb. delbrueckii* (Ebrecht y col., 2010) y de *Lb. paracasei* (Mercanti y col., 2012). Los resultados de esta Tesis demostraron que los biocidas A (cloruro de amonio cuaternario), C (espuma clorada alcalina), E (nonil fenol etoxilado y ácido fosfórico) y F (N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropano-1,3-diamina) fueron muy eficaces para la inactivación de los fagos de *Leuconostoc* en estudio, a concentraciones iguales o menores a las recomendadas por los proveedores.

En particular, los biocidas A (0,50 % v/v), C (2,5 % v/v) y E (0,8 % v/v) causaron una rápida inactivación fágica en todos los casos. Ninguno de los fagos fue detectado luego de 2 min de tratamiento con dichos biocidas, obteniéndose valores de T₉₉ inferiores a 2 min.

Similares resultados fueron reportados para fagos de *Lb. paracasei* (Mercanti y col., 2012). Adicionalmente, un estudio realizado por Ebrecht y col. (2010) reveló que el biocida A (0,5% v/v) no fue capaz de inactivar completamente los fagos de *Lb. delbrueckii* estudiados, durante 30 min de tratamiento, aunque los biocidas C y E fueron altamente letales y condujeron a la destrucción total de las partículas fágicas dentro de los 5 min de incubación. En esta Tesis, el biocida F (2 % v/v) logró inactivar el 99 % de los fagos de *Leuconostoc* en menos de 7 min de incubación. Si bien la eficiencia de los sanitizantes ensayados depende de sus componentes, un pH extremo también puede ser considerado un factor de inactivación para los viriones. De acuerdo con ésto, los valores extremos de pH de los biocidas E (pH = 1,7) y C (pH = 12,7) podrían ser responsables de la destrucción total de las partículas fágicas. Esta observación es avalada por el hecho de que las partículas fágicas fueron inactivadas completamente en suspensiones acuosas cuyos valores de pH fueron ajustados a los correspondientes de los biocidas. Similares resultados fueron observados por Mercanti y col. (2012).

Analizando la resistencia de los fagos de *Leuconostoc* frente a los distintos tratamientos térmicos y químicos (biocidas) puede observarse que, en general, los fagos de *Leuconostoc* son muy resistentes en comparación con fagos de otras especies que infectan BAL (Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000; Suárez y Reinheimer, 2002; Ebrecht y col., 2010).

Continuando con la caracterización de los fagos de *Leuconostoc*, se estudiaron diversos aspectos de la interacción con sus cepas indicadoras. En primer lugar, se analizó si la presencia de iones Ca^{2+} es imprescindible para completar el ciclo lítico en medio líquido. Una de las estrategias para controlar las infecciones fágicas es el uso de medios inhibidores de fagos que contienen agentes quelantes (fosfatos y citratos) capaces de secuestrar cationes divalentes. Si el ciclo lítico de un fago necesita cationes para poder completarse, el uso de medios inhibidores de fagos podría evitar la proliferación fágica (Whitehead y col., 1993). Para los fagos de *Leuconostoc* LDG, CHA y CHB, la lisis celular en medio líquido se produjo aún en ausencia de Ca^{2+} . Por el contrario, para los fagos CyC1, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 no se observó lisis de las cepas indicadoras en ausencia del mencionado catión. Por lo tanto, el uso de medios inhibidores de fagos, no sería una estrategia eficaz para controlar las infecciones por fagos de *Leuconostoc*, debido a que algunos de ellos proliferan incluso en ausencia de Ca^{2+} . De manera similar a lo

observado en esta Tesis, para otras especies de BAL, la influencia de Ca^{2+} sobre la lisis celular fue dependiente de cada sistema fago/cepa (Quiberoni y col., 2004). En estudios previos, se reportó que los fagos QF9 y CHD de *Lc. lactis* (Suárez y col., 2008), YAB e Ib₃ de *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2004) y seis fagos de *St. thermophilus* (Binetti y col., 2002) necesitaron la presencia del ión Ca^{2+} para completar eficientemente el ciclo lítico. Por el contrario, este catión no fue esencial para los fagos BYM y LL-H de *Lb. delbrueckii* (Quiberoni y col., 2004) ni para los fagos de *Lb. casei / paracasei* estudiados por Capra y col. (2006b), debido a que la lisis celular fue rápida y completa sin la adición de Ca^{2+} .

En este trabajo, el espectro de hospedadores de los fagos de *Leuconostoc* se investigó mediante la aplicación de tres metodologías: *Spot test*, test de turbidez y eficiencia de plaqueo (EOP). La mayoría de los estudios sobre espectro de hospedadores suele llevarse a cabo mediante *Spot test*. Sin embargo, a pesar de ser una técnica muy simple, en muchas ocasiones genera falsos negativos, por lo que debería usarse como técnica de *screening*. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la importancia del uso de las diversas técnicas, debido a que aumenta la veracidad de los resultados. En base a las metodologías aplicadas, se demostró que los fagos de *Leuconostoc* estudiados revelaron un espectro de hospedadores amplio y cruzado, siendo capaces de infectar tanto cepas de *Leuc. mesenteroides* como de *Leuc. pseudomesenteroides*. El espectro cruzado entre diferentes especies de bacterias lácticas es un hecho poco común, y no había sido descrito previamente para el género *Leuconostoc*. En un estudio realizado por Atamer y col. (2011), se reportó que los fagos de *Leuc. mesenteroides* no se propagaron sobre cepas de *Leuc. pseudomesenteroides* y viceversa. De forma similar, Kot y col. (2014) no evidenciaron espectros cruzados entre los fagos y cepas de distintas especies pertenecientes al género *Leuconostoc*. Existen pocos casos reportados de fagos que infectan diferentes especies de BAL. En este sentido, Lu y col. (2003) evidenciaron que dos fagos aislados de fermentaciones de chucrut fueron capaces de infectar dos especies distintas, aunque ecológicamente relacionadas de *Lactobacillus* (*Lb. brevis* y *Lb. plantarum*).

Las experiencias de crecimiento en un paso se emplean para conocer ciertos parámetros que caracterizan las interacciones fago/cepa. El *burst size* representa una medida de la eficiencia de la producción de fagos. En particular, los fagos CHA y CHB, que poseen un

genoma similar, presentaron valores de *burst size* diferentes, siendo este valor considerablemente mayor para el fago CHA en comparación al del fago CHB y al del resto de los fagos estudiados. Sin embargo, el período de latencia y los valores de *burst time* fueron similares. Los valores de *burst size* para los fagos LDG, CyC1, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 fueron bajos, los períodos de latencia estuvieron comprendidos entre 29 y 62 min, y los *burst times* oscilaron entre 54 y 96 min. Arendt y col. (1991) reportaron valores de *burst size* bajos (entre 16 y 20 UFP/centro de infección) y períodos de latencia de 60 min para los fagos de *Leuconostoc* P58I y P58II. Sin embargo, para el fago de *Leuconostoc* pro2 fue reportado un valor de *burst size* elevado (170 UFP/centro de infección) y *burst time* de 75 min (Sozzi y col., 1978). Los valores de *burst size* para fagos de 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).

El ciclo vegetativo de multiplicación fágica comienza con la adsorción del fago a la pared celular de la bacteria susceptible, evento que es 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 LDG, CHB, CyC1, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 se adsorbieron eficientemente (99 %) en un corto período de tiempo (5 min) sobre sus respectivas cepas indicadoras, valores que se mantuvieron constantes hasta los 20 min de incubación a 30 °C.

Entre los factores que pueden influenciar el proceso de adsorción fágica, podemos mencionar la presencia de cationes divalentes. En este caso, los iones Ca^{2+} no fueron indispensables para que los fagos de *Leuconostoc* se adsorbieran. El mismo comportamiento fue observado para fagos de *Lactococcus* (Suárez y col., 2008; Veessler y col., 2012; Spinelli y col., 2014) y diversas 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; Wang y col., 2010). Sin embargo, el Ca^{2+} fue necesario para la adsorción 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+} estabilizaría el ADN fágico en el interior de la cápside, incrementando la tasa

de adsorción y regulando la eficiencia de la penetración del ADN viral al interior de las células bacterianas.

Cuando se evaluó la influencia del pH en la adsorción fágica, se observó que el porcentaje de adsorción fue alto (97 %) para todos los fagos de *Leuconostoc* estudiados, en un rango de pH entre 4 y 9. Sin embargo, los valores máximos de adsorción (99 %) se obtuvieron a valores de pH entre 5 y 7. Estos datos indican que los fagos de *Leuconostoc* pueden adsorberse eficientemente a sus cepas hospedadoras al pH normal de la leche (cerca de 6,5). Un comportamiento similar fue observado para fagos que infectan a otras especies de BAL (Binetti y col., 2002; Suárez y col., 2008).

En general, la adsorción de los fagos LDG, CHA, CyC1 y Ln-9 sobre sus respectivas cepas indicadoras no fue afectada por las distintas temperaturas ensayadas. Sin embargo, en algunos casos el porcentaje de adsorción disminuyó a 42 °C (fago CHB) y 50 °C (fagos Ln-7 y Ln-8). De forma similar, la adsorción de fagos de *Lactobacillus* sobre su cepa hospedadora fue también estable en un amplio rango de temperaturas (0-37 °C) (Watanabe y col., 1993). Todos los fagos de *Leuconostoc* en estudio mostraron máxima adsorción a la temperatura óptima de desarrollo de las cepas indicadoras (30 °C). Similares resultados fueron observados para otros fagos de BAL (Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004; Capra y col., 2006a, 2006b; Müller-Merbach y col., 2007; Briggiler Marcó y col., 2010; Wang y col., 2010; Trucco y col., 2011; Mercanti y col., 2015).

Un cambio en el estado fisiológico celular bacteriano puede generar variaciones en la eficiencia de infección fágica (Kutter y Goldman, 2008). En esta Tesis, la tasa de adsorción de los fagos LDG, CHA, CHB, Ln-7 y Ln-8, sobre sus cepas indicadoras tratadas térmicamente (no viables) fue más baja en comparación con los valores obtenidos sobre células viables. El mismo comportamiento fue reportado para fagos de *Lb. casei* (Capra y col., 2006a, 2006b), *Lc. lactis* (Suárez y col., 2008), *Lb. delbrueckii* (Trucco y col., 2011) y *Lb. plantarum* (Briggiler Marcó y col., 2010). Sin embargo, para los fagos CyC1 y Ln-9, la adsorción sobre células viables y no viables (tratadas térmicamente) no presentó diferencias. Similares resultados se observaron en otros fagos de BAL (Watanabe y col., 1993; Quiberoni y Reinheimer, 1998; Stiefel, 2000; Binetti y col., 2002; Quiberoni y col., 2004). Como se mencionó anteriormente, la adsorción fágica 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). Debido a que los tratamientos térmicos pueden afectar la estructura de los receptores fágicos ubicados sobre la superficie bacteriana, se obtuvieron células bacterianas no proliferantes mediante el agregado de un agente inhibidor de la síntesis proteica (cloranfenicol) (Briggiler Marcó y col., 2010). Las tasas de adsorción fágica sobre las células bacterianas tratadas con cloranfenicol, no presentaron diferencias con respecto a las obtenidas sobre células viables. Por lo tanto, la reducción en la tasa de adsorción al trabajar con células tratadas térmicamente puede deberse a la naturaleza termo-sensible de los receptores y no a la disminución del contenido energético celular bacteriano. Similares resultados fueron reportados para fagos de *Lb. plantarum* (Briggiler Marcó y col., 2010).

Los estudios de adsorción son usualmente llevados a cabo a valores de m.o.i. bajos, en un rango donde las tasas de adsorción no estén influenciadas por la cantidad de fagos y células bacterianas presentes (Mercanti y col., 2012). Por esta razón, en la mayoría de los ensayos de adsorción se ajusta la m.o.i. a valores cercanos a 0,02. Sin embargo, existen casos en los cuales es necesario utilizar valores más elevados de m.o.i. para que las tasas de adsorción sean elevadas. Ejemplos de este hecho fueron reportados por Briggiler Marcó y col. (2010) quienes utilizaron valores de m.o.i. de 0,1 para fagos de *Lb. plantarum*, mientras que Capra y col. (2006b) usaron valores aún más elevados (m.o.i. = 1,5) para fagos de *Lb. paracasei*. Por este motivo, resulta indispensable establecer, para cada sistema fago/cepa sensible, el rango donde la adsorción no sea afectada por el valor de m.o.i. Para todos los fagos de *Leuconostoc* en estudio, la adsorción fue máxima y constante a valores de m.o.i. menores a 1; en tanto que a valores de m.o.i. mayores, el porcentaje de fagos adsorbidos fue notablemente menor. Esto podría deberse a la presencia de mayor número de viriones respecto del número de sitios receptores ubicados sobre las paredes celulares bacterianas y disponibles para la interacción. Similares resultados fueron observados para el fago iLp84 de *Lb. paracasei* (Mercanti y col., 2012). Por otro lado, puede suponerse que, cuando la cantidad de fagos supera a las células

bacterianas, el número de fagos adsorbidos por célula llegaría a un límite. Dicha hipótesis parece corroborarse para los fagos de *Leuconostoc* en estudio, ya que para valores de m.o.i.c. muy elevados, se alcanzó una "meseta" de aproximadamente cuatro fagos adsorbidos por célula bacteriana. Estos resultados son muy interesantes, ya que hasta el momento no existen datos publicados para fagos de *Leuconostoc*. Según la hipótesis formulada por Mercanti y col. (2012), la adsorción de tan sólo 4 fagos por célula podría ser debida a la presencia de un número muy bajo de receptores fágicos, o a un impedimento estérico de otra naturaleza.

Los estudios sobre receptores fágicos se pueden realizar sobre células bacterianas enteras o sobre paredes celulares purificadas. Estos análisis involucran tratamientos químicos y enzimáticos que afectan o destruyen, de forma selectiva, componentes de la superficie celular. Un procedimiento simple para lograr la ruptura de las células bacterianas se basa en la agitación de suspensiones celulares mediante un Vórtex en presencia de perlas de vidrio (Quiberoni y col., 2000). Esta metodología fue aplicada en la presente Tesis para obtener paredes celulares a partir de las cepas de *Leuconostoc* estudiadas. Sin embargo, solamente fue posible obtener paredes celulares a partir de *Leuc. pseudomesenteroides* R707. Por este motivo, se utilizaron células enteras para realizar los estudios con el resto de las cepas de *Leuconostoc*. Como se mencionó anteriormente, con el objetivo de identificar los componentes de la pared celular involucrados en la adsorción fágica, se realizaron ensayos de adsorción utilizando paredes celulares o células enteras tratadas química y enzimáticamente. La aplicación de estos tratamientos demostró que los receptores fágicos de las cepas de *Leuconostoc* investigadas, contienen carbohidratos en su composición, debido a que cuando las células enteras o paredes celulares fueron tratadas con mutanolisina o ácido tricloroacético, los porcentajes de adsorción fueron bajos. La mutanolisina es una enzima que hidroliza el peptidoglicano de la pared celular, y el ácido tricloroacético actúa sobre componentes de naturaleza hidrocarbonada de la pared celular, removiendo una fracción soluble de los polisacáridos y dejando una fracción insoluble y los ácidos teicoicos inalterados (Callegari, 1992). 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; Briggiler

Marcó y col., 2011). Por su parte, Valyasevi y col. (1991) y Arendt y col. (1993) reportaron receptores fágicos de origen proteico en *Lc. lactis* subsp. *lactis*.

Considerando la elevada resistencia de los fagos de *Leuconostoc* estudiados frente a biocidas y sanitizantes industriales testeados, así como la gran termorresistencia revelada, resulta muy complejo hallar alternativas tecnológicas que aseguren la remoción efectiva de los mismos del ambiente industrial. Una estrategia utilizada para evitar el ataque fágico de las cepas del fermento, es el uso de derivados espontáneos fagorresistentes obtenidos a partir de las cepas sensibles. De hecho, esta estrategia es aplicada por las empresas que desarrollan fermentos comerciales para mejorar sus cultivos iniciadores y diversificar su oferta de productos. Por este motivo, en esta Tesis se planteó la posibilidad de obtener mutantes espontáneos resistentes a fagos a partir de las cepas de *Leuc. mesenteroides* y *Leuc. pseudomesenteroides* en estudio. Ésta sería una herramienta muy ventajosa para la industria ya que dichas cepas con resistencia fágica mejorada conservarían idéntica *performance* tecnológica (Barrangou y Horvath, 2012).

En esta Tesis, la eficiencia en la obtención de mutantes fagorresistentes fue dependiente de cada sistema fago/cepa. Específicamente, a partir de las cepas de *Leuc. pseudomesenteroides* R707 y *Leuc. mesenteroides* D6a y L79-1 fue posible obtener mutantes espontáneos resistentes a fagos. Sin embargo, a pesar de los numerosos intentos realizados, no fue posible obtener variantes fagorresistentes a partir de *Leuc. mesenteroides* C19A, C19B y D4b. De manera similar, la eficiencia en la obtención de mutantes resistentes a fagos en *Lb. paracasei* A, fue nula (Capra y col., 2011). A partir de *Leuc. mesenteroides* D6a, un 40 % de los mutantes aislados fueron confirmados como derivados resistentes. Sin embargo, la mayoría de los mutantes presuntivos obtenidos a partir de *Leuc. pseudomesenteroides* R707 y de *Leuc. mesenteroides* L79-1, fueron confirmados como mutantes fagorresistentes. En particular, a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1, se aislaron mutantes fagorresistentes enfrentando esta cepa al fago Ln-9, y también exponiéndola a un cóctel compuesto por seis fagos. La elevada eficiencia de aislamiento de derivados fagorresistentes confirmados a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1, marcó una diferencia con respecto a la escasa eficiencia en la obtención de derivados confirmados a partir de las demás cepas de *Leuconostoc* analizadas.

En general, los mutantes fagorresistentes obtenidos mostraron elevada estabilidad del fenotipo fagorresistencia, ya que todos fueron capaces de resistir una fuerte presión fágica provocada mediante la continua adición de fagos durante siete repiques sucesivos. Guglielmotti y col. (2006) reportaron que los derivados obtenidos a partir de *Lb. delbrueckii* YSD V, Ab₁ e Ib₃ presentaron una gran diversidad de la estabilidad del fenotipo fagorresistencia, ya que el 60 %, 83 % y 30 % de sus respectivos mutantes alcanzaron el séptimo repique sin presentar lisis. De manera similar, los mutantes fagorresistentes aislados a partir de *St. thermophilus* (Binetti y col., 2007) y de *Lb. plantarum* (Brigiler Marcó y col., 2011), presentaron estabilidad variable del fenotipo fagorresistencia. Por otro lado, las variantes fagorresistentes de *Lb. helveticus* aisladas utilizando el fago hv mostraron baja estabilidad, ya que sólo el 15 % de ellas evidenció resistencia hasta el séptimo repique (Quiberoni y col., 1998b).

Respecto de los niveles de fagorresistencia de los derivados fagorresistentes estudiados, fueron muy promisorios, igual que los mutantes de otras especies de bacterias lácticas (Quiberoni y col., 1998b; Guglielmotti y col., 2006; Binetti y col., 2007). Moineau y Lévesque (2005) sugieren que las variantes con elevada fagorresistencia (EOP entre 10^{-9} y 10^{-7}) resultan excelentes candidatos para ser usados en elaboraciones lácteas, en tanto que aquellas con bajos niveles de fagorresistencia (EOP entre 10^{-3} y 10^{-1}) podrían no ser seguras durante los procesos fermentativos.

Luego de estudiar la estabilidad de la fagorresistencia y el nivel de fagorresistencia (EOP) de las variantes aisladas, se procedió a analizar las tasas de adsorción fágica de los mutantes espontáneos fagorresistentes, en comparación con la adsorción de las cepas madres sensibles. Para la mayoría de las variantes fagorresistentes de *Leuconostoc*, las tasas de adsorción fueron menores a las obtenidas con las cepas madres, a excepción de aquellas aisladas a partir de *Leuc. mesenteroides* L79-1. Estos resultados indicarían que uno de los mecanismos de resistencia presente en la mayoría de las variantes de *Leuconostoc*, podría ser algún grado de interferencia en la adsorción. Según estudios realizados por Moineau y Lévesque (2005), la disminución de la adsorción podría deberse a la producción de sustancias sobre la superficie bacteriana que, enmascarando de algún modo los sitios receptores, generen una menor eficiencia de adsorción. La interferencia en la adsorción como mecanismo de fagorresistencia

también fue evidenciada para derivados de *Lb. helveticus* (Neviani y col., 1992; Quiberoni y col., 1998b). Sin embargo, para ciertos mutantes fagorresistentes de *St. thermophilus* y de *Lb. delbrueckii*, se encontraron elevadas tasas de adsorción, lo cual indicaría el bloqueo de la inyección del ADN, la presencia de mecanismos de resistencia intracelulares (R/M, Abi o CRISPR) o una combinación de ellos (Binetti, 2001; Guglielmotti y col., 2006). Por otro lado, las tasas de adsorción fágica obtenidas sobre los mutantes de la cepa *Leuc. mesenteroides* L79-1, aislados bajo presión del fago Ln-9, fueron menores a las tasas de adsorción obtenidas para los mutantes aislados bajo presión del cóctel fágico. Esto podría indicar que estos dos grupos de mutantes espontáneos podrían tener mecanismos de resistencia diferentes.

De acuerdo a los perfiles RAPD-PCR obtenidos, las variantes fagorresistentes aisladas presentaron elevada similitud genética (>90 %) con sus respectivas cepas madres, confirmando que cada grupo de mutantes estudiado derivó de las mismas, y que no existió ningún tipo de contaminación externa.

Las cinéticas de desarrollo en LDR (leche descremada reconstituida 10 % m/v), revelaron que tanto *Leuc. pseudomesenteroides* R707 como sus mutantes fagorresistentes demostraron escasa capacidad de desarrollar en ese medio. Este hecho podría deberse a la escasa actividad proteolítica que presentan las cepas de *Leuconostoc*, por lo que requieren la presencia de otros géneros de BAL capaces de metabolizar proteínas de la leche, para luego consumir los aminoácidos liberados. Por este motivo, en general *Leuconostoc* es usado en combinación con cepas de *Lactococcus*, las cuales acidifican la leche y permiten el posterior desarrollo de *Leuconostoc* (Sánchez y col., 2005; Nieto-Arribas y col., 2010). Por otro lado, *Leuc. mesenteroides* D6a y sus mutantes fagorresistentes fueron capaces de desarrollar y acidificar adecuadamente la leche luego de 24 h de incubación (30 °C), aunque el desempeño de las variantes en LDR fue inferior al de la cepa madre, demostrado por mayores valores de pH y menor producción de acidez. *Leuc. mesenteroides* L79-1 y sus mutantes fagorresistentes acidificaron moderadamente la leche, y el desarrollo de los mutantes fue similar al de la cepa madre.

Todo proceso tecnológico ligado a fermentaciones bacterianas es vulnerable a infecciones por fagos. Las infecciones fágicas pueden entorpecerlo y, en casos extremos, inhibir

completamente la acción de las bacterias del fermento, malogrando la elaboración del alimento fermentado. Las empresas dedicadas a la elaboración de fermentos se enfrentan a la compleja tarea de la búsqueda de cepas para el diseño de sus fermentos, los cuales además de un buen desempeño tecnológico deben ser capaces de resistir los ataques fágicos. Investigaciones recientes demuestran que los sistemas CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), presentes en bacterias, otorgan inmunidad heredable frente a fagos, por lo que resultan una herramienta ventajosa para el desarrollo de cultivos fagorresistentes.

Con el objetivo de comenzar el estudio de sistemas CRISPR en cepas de *Leuconostoc*, se realizó una búsqueda en distintas bases de datos *online*. Sin embargo, debido a la imposibilidad de estudiar las estructuras CRISPR en cepas de *Leuconostoc*, se inició el estudio en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*. De acuerdo a las búsquedas realizadas en las bases de datos *online*, fue posible encontrar 16 cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* que exhibieron al menos una secuencia CRISPR confirmada en su cromosoma. En particular, las cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* presentaron un sistema CRISPR-Cas del tipo II, constituido por una secuencia líder, cuatro genes *cas* y un arreglo CRISPR. Los sistemas CRISPR-Cas tipo II son los únicos activos en bacterias lácticas (Makarova y col., 2011). Las repeticiones que componen el arreglo CRISPR estuvieron muy conservadas entre cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus*. Por otro lado, al igual que lo observado por Douillard y col. (2013) en cepas de *Lb. rhamnosus*, se encontró que la secuencia líder en las cepas analizadas, estaría ubicada entre el arreglo CRISPR y el gen *csn2*. La secuencia PAM (5'-NGAA-3') deducida a partir de las secuencias adyacentes a los protoespaciadores, fue similar a la encontrada por Sanozky-Dawes y col. (2015) (5'-NTAA-3') en *Lb. gasseri*. Adicionalmente, una de las secuencias PAM previamente identificada en *St. thermophilus* (Horvath y col., 2008), fue similar a la hallada en este estudio (5'-AGAAW-3').

Con el objetivo de investigar si los sistemas CRISPR-Cas presentes en las cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* en estudio, podrían ser responsables de la protección frente a ADN exógeno (fagos), se realizaron búsquedas (Blastn) de los espaciadores en bases de datos de virus (GenBank). Dicho análisis confirmó la presencia de numerosos espaciadores idénticos a secuencias genómicas de fagos que infectan *Lactobacillus* del grupo *casei*. De forma similar, en estudios realizados en algunas cepas de lactobacilos del grupo *casei* (Douillard y col., 2013), se

verificó la existencia de numerosos espaciadores que presentan identidad con secuencias de fagos que infectan dichas especies, lo que pone en evidencia la ubicuidad de los fagos y la presión selectiva que éstos ejercen en los ambientes industriales (Broadbent y col., 2012).

Cuando se investigó (mediante PCR) la presencia de sistemas CRISPR-Cas en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei* de la colección del INLAIN (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus*), el 70 % de las cepas estudiadas exhibió amplificación. Un porcentaje menor (40 %) fue reportado por Grissa y col. (2007) cuando se analizaron sistemas CRISPR-Cas en el cromosoma de 1200 cepas bacterianas de diferentes géneros.

Como se mencionara anteriormente, la escasez de información a nivel molecular (secuencias genómicas completas) para cepas de *Leuconostoc* y la disponibilidad relativa a secuencias CRISPR en cepas de *Lactobacillus* del grupo *casei*, fueron el fundamento para iniciar estos estudios. A través de estas investigaciones se adquirirán nuevos conocimientos, tanto en herramientas informáticas como en técnicas de biología molecular, para luego estudiar dichos sistemas en otras especies de bacterias lácticas. Los resultados que se obtengan darán inicio a una segunda etapa de estudio, puramente aplicada y dirigida a atender la continua y creciente demanda, tanto del sector lácteo como de los fabricantes de fermentos, de alternativas válidas para contrarrestar las gravísimas consecuencias de las infecciones fágicas en los ambientes industriales.

A circular, grayscale microscopic image of biological cells, likely bacteria or fungi, showing various cellular structures and textures. The word "CONCLUSIONES" is overlaid in the center in a bold, black, sans-serif font.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se caracterizaron fagos de *Leuconostoc*, que evidenciaron diferencias fenotípicas y genotípicas.

De acuerdo a la similitud de las secuencias nucleotídicas, se los clasificó en dos grupos, notablemente diferentes. Los genomas de los fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 mostraron mayor similitud con fagos que infectan cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, mientras que el genoma del fago LDG, mostró alta similitud con fagos que infectan cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

La caracterización molecular de los fagos de *Leuconostoc* evidenció genomas de ADN lineal de doble cadena, con tamaños que oscilaron entre 26,5 y 28,9 kb y mecanismo de empaquetamiento del ADN genómico del tipo *cos* para todos ellos. De acuerdo a su morfología, todos los fagos estudiados se incluyeron en la familia *Siphoviridae*.

La determinación de espectro de hospedadores arrojó resultados sorprendentes, ya que todos los fagos analizados fueron capaces de infectar a todas las cepas en estudio, tanto *Leuc. mesenteroides* como *Leuc. pseudomesenteroides*.

Los factores ambientales y fisiológicos presentaron escasa influencia sobre la adsorción fágica a células de *Leuconostoc*. Esta etapa del ciclo vital fue solamente afectada por ciertos factores: tratamiento térmico de la cepa hospedadora, incubación a temperaturas de 50 °C y valores extremos de pH. Desafortunadamente, estas condiciones no pueden ser aplicadas durante la elaboración de productos lácteos fermentados, limitando la posibilidad de aplicar ciertas estrategias para disminuir la propagación fágica.

El estudio de los receptores fágicos reveló la naturaleza hidrocarbonada de los mismos, aunque no se identificaron los compuestos involucrados.

Con respecto al estudio de diversas estrategias que podrían aplicarse para disminuir, de manera directa o indirecta el riesgo de infecciones fágicas, 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 90 °C durante 2 min produciría la inactivación completa de las partículas fágicas. En cuanto al tratamiento con agentes químicos, el ácido peracético, y los biocidas A (cloruro de amonio cuaternario), C (espuma

clorada alcalina) y E (nonil fenol etoxilado y ácido fosfórico), fueron los más efectivos ya que produjeron la inactivación viral dentro de los 2 min de exposición. Estos biocidas podrían ser utilizados para la limpieza de equipos. 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.

Por otro lado, fue posible obtener mutantes fagorresistentes mediante metodologías naturales, por lo que no existirían restricciones reglamentarias para su uso.

En la presente Tesis, se comenzó con el estudio de sistemas CRISPR-Cas en bacterias ácido lácticas. Dichos sistemas otorgan inmunidad a las bacterias frente a fagos, por lo que el estudio de los mismos podría generar una herramienta ventajosa para el desarrollo de cultivos fagorresistentes.

A circular, grayscale microscopic image showing various biological structures, likely cells or tissues, with a central focus on a large, textured, cylindrical structure. The background is filled with smaller, less distinct structures, creating a complex, organic pattern.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Ackermann, H.W. (2009) *Phage classification and characterization*. Methods Mol. Biol. 501: 127-140.

Ackermann, H.W. y Prangishvili, D. (2012) *Prokaryote viruses studied by electron microscopy*. Arch. Virol. 157: 1843-1849.

Ackermann, H.W.; Tremblay, D. y Moineau, S. (2004) *Long-term bacteriophage preservation*. WFCF Newsletter 38: 35-40.

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*. Nucl. Acids Res. 20: 5137-5142.

Ali, Y.; Kot, W.; Atamer, Z.; Hinrichs, J.; Vogensen, F.K.; Heller, K.J. y Neve, H. (2013) *Classification of lytic bacteriophages attacking dairy Leuconostoc starter strains*. Appl. Environ. Microbiol. 79: 3628-3636.

Antón, A.I.; Martínez-Murcia, A.J. y Rodríguez-Valera F. (1999) *Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181: 2703-2709.

Antunes, A.; Rainey, F.A.; Nobre, M.F.; Schumann, P.; Ferreira, A.M., Ramos, A.; Santos, S.H. y Da Costa, M.S. (2002) *Leuconostoc ficulneum sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of Lactobacillus fructosus as Leuconostoc fructosum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 647-655.

Arendt, E.K.; Neve, H.A. y Hammes W.P. (1991) *Characterization of phage isolates from a phage-carrying culture of Leuconostoc oenos 58N*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 220-224.

Arendt, E.K.; Van de Guchte, M.; Coffey, A.; Daly, C. y Fitzgerald. G.F. (1993) *Molecular genetics of bacteriophages of lactic acid bacteria*. Le Lait 73: 191-198.

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.

Auad, L.; Ruiz Holagdo, A.A.P.; Forsman, P.; Alatossava, T. y Raya, R.R. (1997) *Isolation and characterization of a new Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus temperate bacteriophage*. J. Dairy Sci. 80: 2706-2712.

Azcarate-Peril, M.A. y Klaenhamer, 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.) Blackwell Publishing, Iowa, USA, p. 35-56.

Barrangou, R. y Horvath P. (2012) *CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification*. Ann. Rev. Food Sci. Technol. 3: 143-62.

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

Belcaid, M.; Bergeron, A. y Poisson, G. (2011) *The evolution of the tape measure protein: units, duplications and losses*. BMC Bioinformatics doi: 10.1186/1471-2105-12-S9-S10.

Bellengier, P.; Richard, J. y Foucaud, C. (1997a) *Associative growth of Lactococcus lactis and Leuconostoc mesenteroides strains in milk*. J. Dairy Sci. 80: 1520-1527.

Bellengier, P.; Richard, J. y Foucaud, C. (1997b) *Nutritional requirements of Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides and subsp. dextranicum for growth in milk*. J. Dairy Res. 64: 95-103.

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. 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.; 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.; Suárez, V.; Tailliez, P. y Reinheimer, J.A. (2007) *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: 1115-1122.

Birge, E.A. (1994) *Bacterial and bacteriophage genetics*. En: *T4 bacteriophage as a model genetic system*. (Ed.: Birge, E.A.) Springer New York, Inc., New York, USA, p. 137-173.

Bjorkroth, K.J.; Geisen, R.; Schillinger, U.; Weiss, N.; De Vos, P.; Holzapfel, W.H.; Korkeala, H.J. y Vandamme, P. (2000) *Characterization of Leuconostoc gasicomitatum sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3764-3772.

Boizet, B.; Mata, M.; Mignot, O.; Ritzenthaler, P. y Sozzi, T. (1992) *Taxonomic characterization of Leuconostoc mesenteroides and bacteriophages*. FEMS Microbiol. Lett. 90: 211-216.

Briggiler Marcó, M.; De Antoni, G.L.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2009) *Thermal, chemical, and photocatalytic inactivation of Lactobacillus plantarum bacteriophages*. J. Food Prot. 72: 1012-1019.

Briggiler Marcó, M.; Moineau, S. y Quiberoni, A. (2012) *Bacteriophages and dairy fermentations*. Review. Bacteriophage 2: 149-158.

Briggiler Marcó, M.; Reinheimer J. y Quiberoni A. (2015) *Phage adsorption and lytic propagation in Lactobacillus plantarum: Could host cell starvation affect them?* BMC Microbiol. 15:273.

Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2011) *Characterization of phage receptors in Lactic acid bacteria*. En: *Food Quality: Control, Analysis and Consumer Concerns* (Eds.: Medina, D.A. y Laine, A.M.) Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, p. 431-442.

Briggiler Marcó, M.; Reinheimer, J.; y Quiberoni, A. (2010) *Phage adsorption to Lactobacillus plantarum: influence of physiological and environmental factors*. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 270-275.

Broadbent, J.R.; Neeno-Eckwall, E.C.; Stahl, B.; Tandee, K.; Cai, H.; Morovic, W.; Horvath, P.; Heidenreich, J.; Perna, N.T.; Barrangou, R. y Steele, J.L. (2012) *Analysis of the Lactobacillus casei supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation*. *BMC Genomics* 13: 533.

Brüssow, H. y Kutter, E. (2005) *Genomics and evolution of tailed phages*. En: *Bacteriophages: Biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 91-128.

Buckenhüskes, H.J. (1993) *Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities*. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 253-272.

Burstein, D.; Sun, C.L.; Brown, C.T.; Itai Sharon, I.; Anantharaman, K.; Probst, A.J.; Thomas, B.C. y Banfield, J.F. (2016) *Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems*. *Nat. commun.* Article number: 10613. doi: 10.1038/ncomms10613.

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*.

Capra, M.L.; Guglielmotti, D.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2016) *Bacteriophage: Biological Aspects. Reference Module in Food Sciences*. Elsevier p. 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00637-5>. ISBN: 9780081005965.

Capra, M.L.; Mercanti, D.J.; Rossetti, L.C.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2011) *Isolation and phenotypic characterization of Lactobacillus casei and Lactobacillus paracasei bacteriophage-resistant mutants*. *J. Appl. Microbiol.* 111: 371-381.

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. (2004) *Thermal and chemical resistance of Lactobacillus casei and Lactobacillus paracasei bacteriophages*. Lett. Appl. Microbiol. 38: 499-504.

Capra, M.L.; Quiberoni, A. y Reinheimer, J.A. (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.) Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, p. 391-406.

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.

Cardamone, L.; Quiberoni, A.; Mercanti, D.J.; Fornasari, M.E.; Reinheimer, J.A. y Guglielmotti D.M. (2011) *Adventitious dairy Leuconostoc strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters*. Dairy Sci. Technol. 91: 457-470.

Carlson, K. (2005) *Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches*. En: *Bacteriophages: Biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 437-488.

Carminati, D.; Giraffa, G.; Zago, M.; Briggiler Marcó, M.; Guglielmotti, D.; Binetti, A. y Reinheimer, J. (2016) *Lactic acid bacteria for dairy fermentations: specialized starter cultures to improve dairy products*. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria. novel applications, second edition* (Eds.: Mozzi, F.; Raya R. y Vignolo G.) John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex. p. 191-208.

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.

Carr, F.J.; Chill, D. y Maida, N. (2002) *The lactic acid bacteria: A literature survey*. Crit. Rev. Microbiol. 28: 281-370.

- Chow, J.J.; Batt, C.A. y Sinskey, A.J. (1988) *Characterization of Lactobacillus bulgaricus ch2*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1138-1142.
- Cibik, R.; Lepage, E. y Tailliez, P. (2000) *Molecular diversity of Leuconostoc mesenteroides and Leuconostoc citreum isolated from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16s rDNA sequencing and 16s rDNA fragment amplification*. Syst. Appl. Microbiol. 23: 267-278.
- Cogan, T.M. y Jordan, K. N. (1994) *Metabolism of Leuconostoc bacteria*. J. Dairy Sci. 77: 2704-2717.
- 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.) Blackwell Publishing, Iowa, USA, p., 89-109.
- Collins, M.D.; Samelis, J.; Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S. (1993) *Taxonomic studies on some Leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species*. J. Appli Bacteriol. 75: 595-603.
- Cotter, P.D.; Hill, C. y Ross, R.P. (2005) *Bacteriocins: developing innate immunity for food*. Nat Rev Microbiol. 3: 777-88.
- Craig, J.; Oberg, C. J. y Broadbent, J. R. (1993) *Thermophilic starter cultures. Another set of problems*. J. Dairy Sci. 76: 2392-2406.
- Crow, V.L.; Liu, S.Q. y Holland, R. (1998) *The diversity of amino acid utilisation and ethyl butyrate formation by dairy bacteria*. Aust. J.Dairy Technol. 53: 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.
- Davey, G.P.; Ward, L.J.H. y Brown, J.C.S. (1995) *Characterization of four Leuconostoc bacteriophages isolated from dairy fermentations*. FEMS Microbiol. Lett. 128: 21-26.
- Davis, C.; Silveira, N.F.A. y Fleet, G.H. (1985) *Occurrence and properties of bacteriophages of Leuconostoc oenos in Australian wines*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 872-876.

De Angelis, M. y Gobbetti, 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 Fabrizio, S.V.; Ledford, R.A. y Parada, J.L. (1999) *Heat resistance of Lactococcus lactis bacteriophages*. *Microbiol. Alim. Nutr.* 17: 191-198.

Deveau, H.; Barrangou, R.; Garneau, J.E.; Labonté, J.; Fremaux, C.; Boyaval, P.; Romero, D.A.; Horvath, P. y Moineau, S. (2008) *Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190: 1390-1400.

Dicks, L.M.T.; Fantuzzi, L.; Gonzalez, F.C.; du Toit, M. y Dellaglio, F. (1993) *Leuconostoc argentinum sp. nov., isolated from Argentine raw milk*. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 43: 347-351.

Dicks, L.M.T.; Janssen, B. y Dellaglio, F. (1995) *Differentiation of Carnobacterium divergens and Carnobacterium piscicola by numerical analysis of total soluble cell protein patterns and DNA-DNA hybridization*. *Curr. Microbiol.* 31: 77-79.

Douillard, F.P.; Ribbera, A.; Kant, R.; Pietila, T.E.; Järvinen, H.M.; Messing, M.; Randazzo, C.L.; Paulin, L.; Laine, P.; Ritari, J.; Caggia, C.; Lähteinen T.; Brouns, S.J.J.; Satokari, R.; von Ossowski, I.; Reunanen, J.; Palva, A. y de Vos W.M. (2013) *Comparative genomic and functional analysis of 100 Lactobacillus rhamnosus strains and their comparison with strain GG*. *PLOS Genet.* 9 (8):e1003683.

Duplessis, M. y Moineau, S. (2001) *Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in Streptococcus thermophilus bacteriophages*. *Mol. Microbiol.* 41: 325-336.

Dupont, K.; Vogensen, F.K.; Neve, H.; Bresciani, J. y Josephsen, J. (2004) *Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5818-5824.

Ebrecht, A.; Guglielmotti, D.M.; Tremmel, G.; Reinheimer, J.A. y Suárez, V.B. (2010) *Temperate and virulent Lactobacillus delbrueckii bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance*. *Food Microbiol.* 27: 515-520.

Emond, E. y Moineau, S. (2007) *Bacteriophages and food fermentations*. En: *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology* (Eds.: Mc Grath, S. y van Sinderen, D.) Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 93-124.

Ennahar, S.; Cai, Y. y Fujita, Y. (2003) *Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 444-451.

Foucaud, C.; Hemme, D. y Desmazeaud, M. (2001) *Peptide utilization by Lactococcus lactis and Leuconostoc mesenteroides*. Lett. Appl. Microbiol. 31: 20-25.

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, Inc., New York, USA, p. 1-23.

Garneau, J. y Moineau, S. (2011) *Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations*. Microb. Cell Fact. 10 (Suppl 1):S20.

Gautam, N. y Sharma, N. (2009) *Bacteriocin: safest approach to preserve food products*. Indian J. Microbiol. 49: 204-11.

Giraffa, G.; Rossetti, L. y Neviani, E. (2000) *An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria*. J. Microbiol. Meth. 42: 175-184.

Greer, G.G.; Dilts, B.D. y Ackermann, H.W. (2007) *Characterization of a Leuconostoc gelidum bacteriophage from pork*. Int. J. Food Microbiol. 114: 370-375.

Grissa, I.; Vergnaud, G. y Pourcel C. (2007) *The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats*. BMC Bioinformatics 8:172.

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.; Mercanti, D. y Briggiler Marcó, M.) (2012a) *Infective cycle of dairy bacteriophages*. En: *Bacteriophages in Dairy Processing*. (Eds.: Quiberoni A. del L. y Reinheimer, J.A) Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, p. 99-122.

Guglielmotti, D.M.; Mercanti, D.J.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. del L. (2012b) *Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages*. Front. Microbiol. 2:282.

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.

Guttman, B.; Raya, R. y Kutter, E. (2005) *Basic phage biology*. En: *Bacteriophages: Biology and applications* (Eds.: Kutter, E. y Sulakvelidze, A.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 29-66.

Hassan, A.N. y Frank, J.F. (2001) *Starter cultures and their use*. En: *Applied Dairy Microbiology* (Eds.: Marth, E.H. y Steele, J.L.) 2° Edición, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p. 151-206.

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. 136-141.

Hemme, D. (2012) *Leuconostoc and its use in dairy technology*. En: *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second edition* (Eds.: Hin Hui, Y.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 73-108.

Hemme, D. y Foucaud-Scheunemann, C. (2004) *Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods*. Review. Int. Dairy J. 14: 467-494.

Holzappel, W.; Schillinger, U. y Buckenhüskes, H. (2008) *Sauerkraut*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 395-412.

Horvath P.; Barrangou P.; Fremaux C.; Boyaval P. y Romero D (2012) *Use of CRISPR associated genes (CAS)* European Patent Specification EP 2 325 332 B1, Bulletin 2012/44, 31.10.2012.

Horvath, P. y Barrangou, R. (2010) *CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea*. Science 327: 167-170.

Horvath, P.; Romero, D.A.; Coûté-Monvoisin, A.C.; Richards, M.; Deveau, H.; Moineau, S.; Boyaval, P.; Fremaux, C. y Barrangou, R. (2008) *Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. 190: 1401-12.

Huey, B. y Hall, J. (1989) *Hypervariable DNA finger printing in Escherichia coli: mini satellite probe from bacteriophage M13*. J. Bacteriol. 171: 2528-2532.

- Hughenoltz, J. (1993) *Citrate metabolism in lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 12: 165-178.
- Jang, S.H.; Hwang, M.H. y Chang, H.I. (2010) *Complete genome sequence of Φ MH1, a Leuconostoc temperate phage*. Arch. Virol. 155: 1883-1885.
- Jończyk, E.; Kłak M.; Międzybrodzki, R. y Górski, A. (2011) *The influence of external factors on bacteriophages*. Folia Microbiol. 56: 191-200.
- 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, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p. 295-351.
- Kaneko, T.; Iwano, S. y Kitahara, K. (1955) *Bacteriophage phenomena in fermentative microorganisms. Part 2. Effect of temperature on a Leuconostoc phage*. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 29: 784-788.
- Katsura, I. (1990) *Mechanism of length determination in bacteriophage lambda tails*. Adv. Biophys. 26: 1-18.
- Kim, B.; Lee, J.; Jang, J.; Kim, J. y Han, H. (2003) *Leuconostoc inhae sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1123-1126.
- Klaenhammer, T.R. (1988) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Biochemie 70: 337-349.
- Kleppen, H.P.; Nes, I.F. y Holo, H. (2012) *Characterization of a Leuconostoc bacteriophage infecting flavor producers of cheese starter cultures*. Appl. Environ. Microbiol. 78: 6769-6772.
- Kot, W.; Hammer, K.; Neve, H. y Vogensen, F.K. (2013) *Identification of the receptor-binding protein in lytic Leuconostoc pseudomesenteroides bacteriophages*. Appl. Environ. Microbiol. 79: 3311-3314.
- Kot, W.; Hansen, L.H.; Neve, H.; Hammer, K.; Jacobsen, S.; Pedersen, P.D.; Sørensen, S.J.; Heller, K.J. y Vogensen, F.K. (2014) *Sequence and comparative analysis of Leuconostoc dairy bacteriophages*. Int. J. Food Microbiol. 176: 29-37.
- Kulwichit, W.; Nilgate, S.; Chatsuwan, T.; Krajiw, S.; Unhasuta, C. y Chongthaleong, A. (2007) *Accuracies of Leuconostoc phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays*. BMC Infect. Dis. 7: 69.

Kutter, E. y Goldman, E. (2008) *Introduction to bacteriophages*. En: *Practical handbook of microbiology* (Eds.: Goldman, E. y Green, H.L.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 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 Raton, FL, USA, p. 165-222.

Labrie S.L.; Samson, J.E. y Moineau, S. (2010) *Bacteriophage resistance mechanisms*. *Nature Rev. Microbiol.* 8: 317-327.

Lane, D.J. (1991) *16S/23S rRNA sequencing*. En: *Nucleic acids techniques in bacterial systematics* (Eds.: Stackebrandt, E. y Goodfellow, M.), John Wiley & Sons, Chichester. p. 115-147.

Leiva-Quiros, A. y McCleskey, C.S. (1947) *The application of bacteriophage and serology in the differentiation of strains of Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 54: 709-713.

Lillehaug, D. (1997) *An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages*. *J. Appl. Microbiol.* 83: 85-90.

Limsowtin, G.K.Y. y Terzaghi, B.E. (1976) *Phage resistant mutants: their selection and use in cheese factories*. *J. Dairy Sci. Technol.* 11: 251-256.

Liu, S.Q.; Holland, R. y Crow, V.L. (2003) *The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination*. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 257-269.

Lopez-Diaz, T.M.; Alonso, C.; Roman, C.; Garcia-Lopez, M.L. y Moreno, B. (2000) *Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese*. *Food Microbiol.* 17: 23-32.

Lu, Z.; Altermann, E.; Breidt, F. y Kozyavkin, S. (2010) *Sequence analysis of Leuconostoc mesenteroides bacteriophage 1-A4 isolated from an industrial vegetable fermentation*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1955-1966.

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. (2003) *Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage, JL-1, from a cucumber fermentation*. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 225-235.

Lyne, J. (2011) *Technological importance in the dairy industry*. En: *Encyclopedia of dairy sciences* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2º Edición, Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 439-444.

Macedo, A.C. y Malcata, F.X. (1997) *Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 205: 25-30.

Mahony, J.; Kot, W.; Murphy, J.; Ainsworth, S.; Neve, H.; Hansen, L.H.; Heller, K.L.; Sørensen, S.J.; Hammer, K.; Cambillau, C.; Vogensen, F.K. y van Sinderen D. (2013) *Investigation of the relationship between lactococcal host cell wall polysaccharide genotype and 936 phage receptor binding protein phylogeny*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 4385-4392.

Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Karamychev, V.; Polouchine, N.; Shakhova, V.; Grigoriev, I.; Lou, Y.; Rohksar, D.; Lucas, S.; Huang, K.; Goodstein, D.M.; Hawkins, T.; Plengvidhya, V.; Welker, D.; Hughes, J.; Goh, Y.; Benson, A.; Baldwin, K.; Lee, J.H.; Diaz-Muniz, I.; Dosti, B.; Smeianov, V.; Wechter, W.; Barabote, R.; Lorca, G.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Ganesan, B.; Xie, Y.; Rawsthorne, H.; Tamir, D.; Parker, C.; Breidt, F.; Broadbent, J.; Hutkins, R.; O'Sullivan, D.; Steele, J.; Unlu, G.; Saier, M.; Klaenhammer, T.; Richardson, P.; Kozyavkin, S.; Weimer, B. y Mills, D. (2006) *Comparative genomics of the lactic acid bacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 15611-15616.

Makarova, K.S.; Haft, D.H.; Barrangou, R.; Brouns, S.J.; Charpentier, E.; Horvath, P.; Moineau, S.; Mojica, F.J.; Wolf, Y.I.; Yakunin, A.F.; van der Oost, J. y Koonin E.V. (2011) *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems*. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 467-477.

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, Inc., Marcel Dekker, New York, USA, p. 419-430.

Martín, M.C.; Alonso, J.C.; Suárez, J.E. y Alvarez, M.A. (2000) *Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2599-2604.

Martínez-García, M.; Santos, F.; Moreno-Paz M.; Parro, V. y Antón J. (2014) *Unveiling viral-host interactions within the 'microbial dark matter'*. Nat. Commun. 5, Article number: 4542 doi:10.1038/ncomms5542.

Mäyra-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, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p. 175-198.

Mc Grath, S.; Neve, H.; Seegers, J.F.; Eijlander, R.; Vegge, C.S. y Brøndsted, L. (2006) *Anatomy of a lactococcal phage tail*. J. Bacteriol. 188: 3972-3982.

Mendonça Moraes, P.; Martins Perin, L.; Silva Júnior, A. y Nero, L.A. (2013) *Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria*. Braz. J. Microbiol. 44: 109-112.

Menéndez, S.; Rodríguez-Otero, J.L. y Hermida, M. (2000) *Leuconostocs en quesería*. Alimentación, equipos y tecnología 19: 67-70.

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.

Mercanti, D.J.; Rousseau, G.M.; Capra, M.L.; Quiberoni, A.; Tremblay, D.M.; Labrie, S.J. y Moineau, S. (2015) *Genomic Diversity of Phages Infecting Probiotic Strains of Lactobacillus paracasei*. Appl. Environ. Microbiol. 82: 95-105.

Mills, S.; Griffin, C.; Coffey, A.; Meijer, W.C.; Hafkamp, B. y Ross, R.P. (2010) *CRISPR analysis of bacteriophage-insensitive mutants (BIMs) of industrial Streptococcus thermophilus - implications for starter design*. J. Appl. Microbiol. 108: 945-955.

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, USA, 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.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 353-394.
- 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.
- Mundt, J.O. (1970) *Lactic Acid Bacteria Associated with Raw Plant Food Material*. *J. Milk Food Technol.* 33: 550-553.
- Murphy, J.; Bottacini, F.; Mahony, J.; Kelleher, P.; Neve, H., Zomer, A.; Nauta, A. y van Sinderen, D. (2016) *Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal Siphoviridae phages*. *Sci. Rep.* Article number: 21345. doi: 10.1038/srep21345.
- Neve, H. (1996) *Bacteriophage*. En: *Dairy starter cultures* (Eds.: Logan, T.M. y Accolas, J.P.) VCH Publishers, Inc. New York, USA, p. 157-190.
- Neve, H.; Lilischkis, R. y Teuber, M. (1988) *Characterization of a virulent bacteriophage of Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* 40: 205-212.
- Neviani, E.N., Carminatti, D. y Giraffa, G. (1992) *Selection of some bacteriophage- and lysozyme resistant variants of Lactobacillus helveticus CNRZ 892*. *J. Dairy Sci.* 75: 905-913.
- 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.
- Nieto-Arribas, P.; Sesena, S.; Poveda, J.M.; Palop, L. y Cabezas, L. (2010) *Genotypic and technological characterization of Leuconostoc isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture*. *Food Microbiol.* 27: 85-93.
- Ogier, J.C.; Casalta, E.; Farrokn, C. y Saihi, A. (2008) *Safety assessment of dairy microorganisms: The Leuconostoc genus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 286-290.
- Oh, J.H. y van Pijkeren J.P. (2015) *CRISPR-Cas9-assisted recombineering in Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Res.* 42: 1-11.
- Ono, B.; Heike, C.; Yano, Y.; Inoue, T.; Naito, K.; Nakagami, S. y Yamane A. (1992) *Cloning and mapping of the CYS4 gene of Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 21: 285-289.

Park, K.-Y. y Kim, B.K. (2012) *Current Challenges for Probiotics in Food*. En: *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects*. (Eds.: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C. y Salminen, S.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 187-189.

Pujato, S.; Mercanti, D.J.; Guglielmotti, D.M.; Rousseau, G.M. y Moineau, S. (2015) *Phages of dairy Leuconostoc mesenteroides: Genomics and factors influencing their adsorption*. *Int. J. Food Microbiol.* 201: 58-65.

Pujato, S.A.; Guglielmotti, D.M.; Ackermann, H.W.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2014a) *Leuconostoc bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application*. *Int. J. Food Microbiol.* 177: 81-88.

Pujato, S.A.; Quiberoni, A.; Candiotti, M.C.; Reinheimer, J.A. y Guglielmotti, D.M. (2014b) *Leuconostoc citreum MB1 as biocontrol agent of Listeria monocytogenes in milk*. *J. Dairy Res.* 81: 137-145.

Quiberoni, A. del L. (1997) *Interacción de bacterias lácticas termófilas con bacteriofagos específicos*. Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química.

Quiberoni, A. y Reinheimer, J. (1998) *Physicochemical characterization of phage adsorption to Lactobacillus helveticus ATCC 15807 cells*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 762-768.

Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. y Reinheimer, J. (2008) *New and classical spoilage bacteria causing widespread blowing in Argentinean soft and semihard cheeses*. *Int. J. Dairy Technol.* 61: 358-363.

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. y Ackermann, H.W. (2010) *Streptococcus thermophilus bacteriophages*. *Int. Dairy J.* 20: 657-64.

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. y Reinheimer, J.A. (1999) *Inactivation of Lactobacillus helveticus bacteriophages by thermal and chemical treatments*. J. Food Prot. 62: 894-898.

Quiberoni, A.; Suárez, V.B.; Binetti, A.G. y Reinheimer, J.A. (2011) *Bacteriophage*. En: *Encyclopedia of dairy sciences* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2° Edición (Volumen 1), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 430-438.

Ray, B. y Bhunia A. (2008) *Fundamental Food Microbiology*, Fourth Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

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.

Rihtman, B.; Meaden, S.; Clokie, M.R.J.; Koskella, B. y Millard, A. (2016) *Assessing Illumina technology for the high-throughput sequencing of bacteriophage genomes*. Peer J. 4:e2055. doi: 10.7717/peerj.2055.

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.), Blackwell Publishing, Iowa, USA, p. 111-123.

Rousseau, G.; Deveau, H. y Moineau, S. (2012) *Phage resistance in lactic acid bacteria*. En: *Bacteriophages in Dairy Processing*. (Eds.: Quiberoni A. del L. y Reinheimer, J.A) Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, p. 295-307.

Ruiz-Barba, J.L.; Cathcart, D.P.; Warner, P.J. y Jiménez-Díaz, R. (1994) *Use of Lactobacillus plantarum LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2059-2064.

Sambrook, J.J. y Russell, D.D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sánchez, J.I.; Martínez, B. y Rodríguez, A. (2005) *Rational selection of Leuconostoc strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations*. Int. J. Food Microbiol. 105: 377-387.

Sanozky-Dawes, R.; Selle, K.; O'Flaherty, S.; Klaenhammer, T. y Barrangou, R. (2015) *Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in Lactobacillus gasseri*. Microbiol. 161: 1752-1761.

Saxelin, M.L.; Nurmiäho-Lassila, E.L.; Merilainen, V. y Forsen, R.I. (1986) *Ultrastructure and host specificity of bacteriophages of Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis subsp. diacetylactis and Leuconostoc cremoris from Finnish fermented milk "villi."*. Appl. Environ. Microbiol. 52: 771-777.

Schmitt, P. y Diviès, C. (1991) *Co-metabolism of citrate and lactose by Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. J. Ferment. Bioeng. 71: 72-74.

Schmitt, P.; Vasseur, C.; Phalip, V.; Huang, D.Q.; Diviès, C. y Prévost, H. (1997) *Diacetyl and acetoin production from the co-metabolism of citrate and xylose by Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 715-718.

Séchaud, L.; Callegari, M.L.; Rousseau, M.; Muller, M.C. y Accolas, J.P. (1989) *Relationship between temperate bacteriophage O241 and virulent bacteriophage 832-B1 of Lactobacillus helveticus*. Neth. Milk Dairy J. 43: 261-278.

Seed, K.D.; Lazinski, D.W.; Calderwood S.B. y Camilli A. (2013) *A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity*. Nature 494: 489-491.

Server-Busson, C.; Foucaud, C. y Leveau, J.Y. (1999) *Selection of dairy Leuconostoc isolates for important technological properties*. J. Dairy Res. 66: 245-256.

Shin, C. y Sato, Y. (1979) *Isolation of Leuconostoc bacteriophages from dairy products*. Jpn. J. Zootech. Sci. 50: 419-422.

Smit, G.; Smit, B.A. y Engels, W.J. (2005) *Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products*. FEMS Microbiol. Rev. 3: 591-610.

Sorek, R.; Kunin, V. y Hugenholtz, P. (2008) *CRISPR - a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea*. Nat. Rev. Microbiol. 6: 181-186.

Sozzi, T.; Poulin, J.M.; Maret, R. y Pousaz, R. (1978) *Isolation of a bacteriophage of Leuconostoc mesenteroides from dairy products*. J. Appl. Bacteriol. 44: 159-161.

Spinelli, S.; Bebeacua, C.; Orlov, I.; Tremblay, D.; Klaholz, B.P.; Moineau, S. y Cambillau, C. (2014) *Cryo-electron microscopy structure of lactococcal siphophage 1358 virion*. J. Virol. 88: 8900-8910.

Steinkraus, K. H. (2002) *Fermentation in world food processing*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 1: 23-32.

Stenlid, J.; Karlsson, J.O. y Högberg, N. (1994) *Intraspecific genetic variation in Heterobasidion 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 Magister en Ciencia de Alimentos.

Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. (1997) *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. Int. J. Food Microbiol. 36: 1-29.

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. (2008) *Argentinian Lactococcus lactis bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies*. J. Appl. Microbiol. 104: 371-379.

Suárez, V.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2012) *Bacteriophages in dairy plants*. En: *Bacteriophages in dairy processing* (Eds.: Quiberoni, A. y Reinheimer, J.) Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, p. 53-78.

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.

Surh, J.; Lee Kim, Y.-K. y Kwon, H. (2008) *Korean fermented foods: kimchi and doenjang*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 333-352.

Surono, S. y Hosono, A. (2011) *Starter cultures*. En: *Encyclopedia of dairy science* (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P.) 2° Edición (Volumen 2), Academic Press, Elsevier Science, USA, p. 477-482.

Svensson, U. y Christiansson, A. (1991) *Methods for phage monitoring*. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium. Bulletin 263, p. 29-39.

Tavaria, F.K.; Dahl, S.; Carballo, F.J. y Malcata, F.X. (2002) *Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria*. *J. Dairy Sci.* 85: 2462-2470.

Todorov, S.D. (2010) *Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria*. *Food Control* 21: 1011-1021.

Tortora, G.J., Funke B.R. y Case, C.L. (2010) *Microbiology: an introduction*. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA, USA.

Tremblay, D. y Moineau, S. (1999) *Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of Streptococcus thermophilus*. *Virology* 255: 63-76.

Trias, R.; Badosa, E.; Montesinos, E. y Bañeras, L. (2008) *Bioprotective Leuconostoc strains against Listeria monocytogenes in fresh fruits and vegetables*. *Int. J. Food Microbiol.* 127: 91-98.

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.

Vauterin, L. y Vauterin, P. (1992) *Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms*. *Eur. Microbiol.* 1: 37-41.

Vedamuthu, E.R. (1988) *Engineering flavor into fermented foods*. En: *Handbook of Anaerobic Fermentations* (Eds. Erockson, L.E. y Fung, D.Y.C.) Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Vedamuthu, E.R. (1994) *The dairy Leuconostoc: Use in dairy products*. J. Dairy Sci. 77: 2725-2737.

Veesler, D.; Spinelli, S.; Mahony, J.; Lichiere, J.; Blangy, S.; Bricogne, G.; Legrand, P.; Ortiz-Lombardia, M.; Campanacci, V.; van Sinderen, D. y Cambillau, C. (2012) *Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109: 8954-8958.

Viscardi, M.; Capparelli, R; Di Matteo, R.; Carminati, D.; Giraffa, G. y Iannelli, D. (2003) *Selection of bacteriophages-resistant mutants of Streptococcus thermophilus*. J. Microbiol. Meth. 55: 109-119.

Wang, J.; Hofnung, M. y Charbit, A. (2000) *The C-terminal portion of the tail fiber protein of bacteriophage lambda is responsible for binding to Lamb, its receptor at the surface of Escherichia coli K-12*. J. Bacteriol. 182: 508- 512.

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.

Watanabe, K. y Takesue, S. (1972) *The requirement for calcium in infection with Lactobacillus phage*. J. Gen. Virol. 17: 19-30.

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.

Weimer, B.C.; Blake, M., Hiller A.J. y Davidson, B.E. (1993) *Studies on the isolation of phage-resistant derivatives of Lactococcus lactis subsp. cremoris FG2 with phage sk1*. Aust. J. Dairy Technol. 48: 59-61.

Weinbauer, M.G. (2004) *Ecology of prokaryotic viruses*. FEMS Microbiol. Rev. 28: 127-181.

Whitehead, W.E.; Ayres, J.W. y Sandine, W.E. (1993) *A Review of Starter Media for Cheese Making*. J. Dairy Sci. 76: 2344-2353.

Whitman, P.A. y Marshall, R.T. (1971) *Isolation of psychrophilic bacteriophage host systems from refrigerated food products*. Appl. Microbiol. 22: 220-223.

Widyastuti, Y.; Rohmatussolihat y Febrisiantosa, A. (2014) *The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation*. Food Nutr. Sci. 5: 435-442.

Zacarías, M.F.; Binetti, A.; Laco, M.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2011) *Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products*. Int. Dairy J. 8: 548-555.

Zaunmuller, T.; Eichert, M.; Richter, H. y Uden, G. (2006) *Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 421-429.